

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 010 483**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2012 E 21153891 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025 EP 3875104**

(54) Título: **Composiciones para tratar la eritropoyesis ineficaz**

(30) Prioridad:

17.10.2011 US 201161547932 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.04.2025

(73) Titular/es:

**ACCELERON PHARMA INC. (100.00%)
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139, US**

(72) Inventor/es:

**SEEHRA, JASBIR;
PEARSALL, ROBERT, SCOTT;
KUMAR, RAVINDRA y
SURAGANI, NAGA VENKATA SAI, RAJASEKHAR**

(74) Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 010 483 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para tratar la eritropoyesis ineficaz

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense con n.º de serie 61/547.932, presentada el 17 de octubre de 2011.

10 **Antecedentes de la invención**

El glóbulo rojo, o eritrocito, maduro es responsable del transporte de oxígeno en los sistemas circulatorios de vertebrados. Los glóbulos rojos contienen altas concentraciones de hemoglobina, una proteína que se une al oxígeno en los pulmones a una presión parcial de oxígeno (pO_2) relativamente alta y suministra oxígeno a zonas del cuerpo con una pO_2 relativamente baja.

15 Los glóbulos rojos maduros se producen a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes en un proceso denominado eritropoyesis. La eritropoyesis posnatal se produce principalmente en la médula ósea y en la pulpa roja del bazo. La acción coordinada de diversas rutas de señalización controla el equilibrio de proliferación, 20 diferenciación, supervivencia y muerte celulares. En condiciones normales, los glóbulos rojos se producen a una tasa que mantiene una masa de células rojas constante en el cuerpo, y la producción puede aumentar o disminuir en respuesta a diversos estímulos, incluyendo tensión de oxígeno o demanda de tejido aumentada o disminuida. El proceso de eritropoyesis comienza con la formación de células precursoras con compromiso de linaje y avanza a través de una serie de distintos tipos de células precursoras. Las etapas finales de la eritropoyesis se producen a medida que los reticulocitos se liberan en el torrente circulatorio y pierden sus mitocondrias y ribosomas mientras 25 adoptan la morfología del glóbulo rojo maduro. Un nivel elevado de reticulocitos, o una razón reticulocitos:eritrocitos elevada, en la sangre es indicativo de tasas de producción de glóbulos rojos aumentadas.

30 La eritropoyetina (EPO) es ampliamente reconocida como el regulador positivo más significativo de la eritropoyesis posnatal en vertebrados. La EPO regula la respuesta eritropoyética compensatoria a la tensión de oxígeno tisular reducida (hipoxia) y a los bajos niveles de glóbulos rojos o bajos niveles de hemoglobina. En seres humanos, los niveles elevados de EPO fomentan la formación de glóbulos rojos mediante la estimulación de la generación de progenitores eritroides en la médula ósea y el bazo. En ratón, la EPO potencia la eritropoyesis principalmente en el bazo.

35 Los efectos de la EPO están mediados por un receptor de superficie celular perteneciente a la superfamilia de receptores de citocinas. El gen del receptor de EPO humano codifica para una proteína transmembrana de 483 aminoácidos, mientras que se piensa que el receptor de EPO activo existe como complejo multimérico incluso en ausencia de ligando (véase la patente estadounidense n.º 6.319.499). El receptor de EPO de longitud completa 40 clonado expresado en células de mamífero se une a EPO con una afinidad similar a la del receptor nativo en células progenitoras eritroides. La unión de EPO a su receptor provoca un cambio conformacional que da como resultado la activación del receptor y efectos biológicos incluyendo una proliferación aumentada de eritroblastos inmaduros, una diferenciación aumentada de eritroblastos inmaduros, y una apoptosis disminuida en células progenitoras eritroides (Liboi *et al.*, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury *et al.*, 1990, Science 248:378-381).

45 Los médicos usan diversas formas de EPO recombinante para aumentar los niveles de glóbulos rojos en una variedad de entornos clínicos, y particularmente para el tratamiento de anemia. La anemia es una afección ampliamente definida caracterizada por niveles de hemoglobina o glóbulos rojos inferiores a los normales en la sangre. En algunos casos, la anemia está provocada por un trastorno primario en la producción o supervivencia de 50 los glóbulos rojos. Más habitualmente, la anemia es secundaria a enfermedades de otros sistemas (Weatherall y Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175). La anemia puede ser el resultado de una tasa de producción reducida o una tasa de destrucción aumentada de glóbulos rojos o de una pérdida de glóbulos rojos debido a sangrado. La anemia puede ser el resultado de una variedad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, tratamiento quimioterápico, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide, y trasplante de médula ósea.

55 El tratamiento con EPO normalmente provoca un aumento en las hemoglobinas de aproximadamente 1-3 g/dl en seres humanos sanos a lo largo de un periodo de semanas. Cuando se administra a individuos anémicos, este régimen de tratamiento a menudo proporciona aumentos sustanciales de los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos y conduce a mejoras en la calidad de vida y a una supervivencia prolongada. La EPO no es uniformemente eficaz, y muchos individuos son resistentes incluso a dosis altas (Horl *et al.* (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50). Más del 50 % de los pacientes con cáncer tienen una respuesta inadecuada a la EPO, aproximadamente el 10 % con enfermedad renal en estadio final son hiposensibles (Glaspy *et al.* (1997) J Clin Oncol 15, 1218-1234; Demetri *et al.* (1998) J Clin Oncol 16, 3412-3425), y menos del 10 % con síndrome mielodisplásico responden favorablemente (Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67). Varios factores, incluyendo la inflamación, la deficiencia de hierro y vitaminas, una diálisis inadecuada, la toxicidad por aluminio y el hiperparatiroidismo, pueden predecir una respuesta terapéutica deficiente. Los mecanismos moleculares de la resistencia a la EPO aún no están claros.

Evidencias recientes sugieren que dosis más altas de EPO pueden estar asociadas con un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular, crecimiento tumoral y mortalidad en algunas poblaciones de pacientes (Krapf *et al.*, 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4:470-480; Glaspy, 2009, Annu Rev Med 60:181-192). Por tanto, se ha recomendado que los compuestos terapéuticos basados en EPO (agentes estimuladores de eritropoyetina, AEE) se administren a la dosis más baja suficiente para evitar la necesidad de transfusiones de glóbulos rojos (Jelkmann *et al.*, 2008, Crit Rev Oncol Hematol 67:39-61).

La eritropoyesis ineficaz es un término usado para describir un grupo de trastornos eritroides en los que se disminuye la producción de eritrocitos a pesar de un aumento en las etapas más tempranas de la eritropoyesis (véase, por ejemplo, Tanno, 2010, Adv Hematol 2010:358283). La eritropoyesis ineficaz a menudo da lugar a anemia, niveles elevados de eritropoyetina, la formación de números excesivos de precursores de glóbulos rojos y hemocromatosis. Estos fenómenos pueden conducir a su vez a esplenomegalia, trastornos hepáticos y cardíacos y daño óseo, así como otras complicaciones. Debido a que los niveles de eritropoyetina endógena habitualmente son muy altos en pacientes con eritropoyesis ineficaz, los productos terapéuticos basados en EPO a menudo no tratarán la anemia en estos pacientes o pueden provocar un agravamiento de otros aspectos de la enfermedad, tales como esplenomegalia y hemocromatosis.

Por tanto, un objeto de la presente divulgación es proporcionar métodos alternativos para aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o abordar otros trastornos en el contexto de la eritropoyesis ineficaz.

20 Sumario de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Por tanto, la invención se refiere a un polipéptido para su uso en el tratamiento de eritropoyesis ineficaz en un paciente con talasemia, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido es capaz de unirse a GDF8 y/o GDF11.

En realizaciones preferidas, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1.

En realizaciones preferidas adicionales, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1.

35 En otras realizaciones preferidas, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1, pero en donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1.

40 En otras realizaciones o realizaciones incluso más preferidas, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1.

En otras realizaciones preferidas, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1.

45 En otras realizaciones preferidas, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1, pero en donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1.

50 En otras realizaciones o realizaciones incluso más preferidas, el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un polipéptido de ActRIIB y un dominio Fc de inmunoglobulina.

En realizaciones preferidas de las últimas realizaciones, la proteína de fusión comprende además un ligador no estructurado posicionado entre el dominio Fc y ActRIIB.

55 En otras realizaciones preferidas, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 28.

En realizaciones preferidas adicionales, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

60 En otras realizaciones o realizaciones incluso más preferidas, el aminoácido ácido es ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E).

En realizaciones preferidas adicionales, el paciente tiene esplenomegalia.

65 En realizaciones preferidas alternativas, el paciente tiene hemocromatosis.

En parte, la divulgación demuestra que pueden usarse trampas de GDF para tratar la eritropoyesis ineficaz y los trastornos y síntomas que están asociados con la eritropoyesis ineficaz, incluyendo, sin limitación, anemia, esplenomegalia, hemocromatosis, médula ósea hipercelular, niveles elevados de eritropoyetina endógena y daño óseo. El uso de trampas de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos, por ejemplo, para tratar la anemia, se describió en los documentos WO 2010/019261 y WO 2011/020045. En particular, la divulgación demuestra que una trampa de GDF que es una forma soluble de polipéptido de ActRIIB que tiene un residuo ácido en la posición 79 de SEQ ID NO: 1, cuando se administra *in vivo*, aumenta los niveles de glóbulos rojos en la sangre en sujetos sanos normales, así como en modelos animales de anemia y eritropoyesis ineficaz. Sorprendentemente, además de aumentar directamente los niveles de glóbulos rojos, las moléculas dadas a conocer mejoran otros síntomas asociados con la eritropoyesis ineficaz, incluyendo esplenomegalia, hemocromatosis y daño óseo. En algunos casos, estos trastornos asociados son de igual o mayor importancia para la salud y calidad de vida del paciente que la afección anémica. Cualquier referencia en el presente documento a métodos de tratamiento mediante terapia debe interpretarse como una referencia a los compuestos (es decir, polipéptidos), a las composiciones farmacéuticas y a los medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos. Por tanto, en el presente documento se describen, aunque no están cubiertos por las reivindicaciones, métodos para usar trampas de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes y para tratar trastornos asociados con bajos niveles de glóbulos rojos en pacientes que lo necesitan. En particular, la divulgación proporciona métodos para usar polipéptidos trampa de GDF para tratar complicaciones que surgen de trastornos de eritropoyesis ineficaz, incluyendo complicaciones importantes tales como anemia, hemocromatosis tisular, eritropoyesis extramedular, patología ósea inducida por eritroblastos y niveles de eritropoyetina inapropiadamente elevados. En tales trastornos, pueden usarse trampas de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos mientras se reduce la necesidad de transfusiones de glóbulos rojos y terapia de quelación de hierro, y para reducir de ese modo la morbimortalidad asociada con la acumulación de hierro en tejidos vulnerables. En parte, puede usarse una trampa de GDF en combinación con terapias complementarias existentes para la eritropoyesis ineficaz, incluyendo transfusión de glóbulos rojos y terapia de quelación de hierro. También pueden usarse trampas de GDF en combinación con un agonista de hepcidina para tratar la eritropoyesis ineficaz. Tal como se describe en solicitud de patente estadounidense n.º 12/012.652, también pueden usarse trampas de GDF para aumentar la masa muscular y disminuir la masa grasa.

La presente divulgación proporciona trampas de GDF que son polipéptidos de ActRIIB variantes que pueden tener alteraciones de secuencia y truncamientos en el extremo amino terminal y el extremo carboxilo terminal. Las trampas de GDF pueden estar diseñadas para antagonizar preferentemente uno o más ligandos de receptores ActRIIB, tales como GDF8 (también denominado miostatina), GDF11, Nodal, y BMP7 (también denominado OP-1). Los ejemplos de trampas de GDF incluyen un conjunto de variantes derivadas de ActRIIB que tienen una afinidad muy disminuida por la activina. Estas variantes presentan efectos convenientes sobre los glóbulos rojos mientras que reducen los efectos sobre otros tejidos. Los ejemplos de tales variantes incluyen aquellos que tienen un aminoácido ácido (por ejemplo, ácido aspártico, D, o ácido glutámico, E) en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, el polipéptido trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, y polipéptidos que son al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 %, o el 99 % idénticos al mismo.

También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertos como tal por las reivindicaciones, preparaciones farmacéuticas que comprenden una trampa de GDF que se une a un ligando de ActRIIB tal como GDF8, GDF11, activina (por ejemplo, activina B), BMP7 o Nodal, y un portador farmacéuticamente aceptable. La trampa de GDF puede unirse a un ligando de ActRIIB con una K_d menor de 10 micromolar, menor de 1 micromolar, menor de 100 nanomolar, menor de 10 nanomolar, o menor de 1 nanomolar. La trampa de GDF puede inhibir la señalización de ActRIIB, tal como los acontecimientos de transducción de señales intracelulares desencadenados por un ligando de ActRIIB. Una trampa de GDF para su uso en una preparación de este tipo puede ser cualquiera de las dadas a conocer en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 ó 40, o trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 % o el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 ó 40, o trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 % o el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 ó 40 en la que la posición correspondiente a L79 en SEQ ID NO: 1 es un aminoácido ácido. Una trampa de GDF preferida para su uso en una preparación de este tipo consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. Una trampa de GDF puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido de ActRIIB natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 ó 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 ó 40 o una secuencia de SEQ ID NO: 2, que carece de 1, 2, 3, 4, 5 ó 10 hasta 15 aminoácidos en el extremo C-terminal y que carece de 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos en el extremo N-terminal. Un polipéptido preferido comprenderá un truncamiento en relación con SEQ ID NO: 2 ó 40 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo N-terminal y no más de 3 aminoácidos en el extremo C-terminal. Una trampa de GDF puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ActRIIB (por ejemplo, en el dominio de unión a ligando) en relación con un polipéptido de ActRIIB que se produce de manera natural. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glicosilación del polipéptido cuando se produce en un mamífero, insecto u otra célula eucariota o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en relación

con el polipéptido de ActRIIB que se produce de manera natural.

Una trampa de GDF puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido de ActRIIB (por ejemplo, un dominio de unión a ligando de un ActRIIB con una o más variaciones de secuencia) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tal como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, direccionamiento a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede potenciar una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos proteicos, multimerización de la proteína de fusión, y/o purificación. Las proteínas de fusión trampa de GDF pueden incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo natural o mutante) o una albúmina sérica. En determinadas realizaciones, una fusión trampa de GDF comprende un ligador relativamente no estructurado posicionado entre el dominio Fc y el dominio extracelular de ActRIIB. Este ligador no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de entre 3 y 5, 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente libres de estructura secundaria. Un ligador puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede contener, por ejemplo, secuencias de repetición de treonina/serina y glicinas (por ejemplo, singletes o repeticiones TG₄ (SEQ ID NO: 13) o SG₄ (SEQ ID NO: 14)) o una serie de tres glicinas. Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como una etiqueta de epítopo, una etiqueta FLAG, una secuencia de polihistidina, y una fusión GST. Una fusión trampa de GDF puede comprender una secuencia líder. La secuencia líder puede ser una secuencia líder de ActRIIB nativa o una secuencia líder heteróloga. La secuencia líder puede ser una secuencia líder de activador tisular del plasminógeno (TPA). Una proteína de fusión trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la fórmula A-B-C. La porción B es un polipéptido de ActRIIB con truncamiento en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal que consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 2 ó 40. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácido, y ambas porciones A y C son heterólogas con respecto a B. Las porciones A y/o C pueden estar unidas a la porción B mediante una secuencia de ligador.

Una trampa de GDF puede incluir un polipéptido de ActRIIB variante que tiene uno o más residuos de aminoácido modificados seleccionados de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido pegilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico, y un aminoácido conjugado a un agente de derivatización orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno asociado a ActRIIB. Una preparación farmacéutica puede estar sustancialmente libre de pirógenos. En general, es preferible que una trampa de GDF se exprese en una línea celular de mamífero que medie adecuadamente la glicosilación natural de la trampa de GDF para disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Se han usado con éxito líneas celulares humanas y CHO, y se espera que sean útiles otros vectores de expresión de mamífero habituales.

También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertos como tal por las reivindicaciones, productos farmacéuticos envasados que comprenden una preparación farmacéutica descrita en el presente documento y etiquetada para su uso en el aumento de los niveles de glóbulos rojos en un ser humano.

Las trampas de GDF pueden ser polipéptidos de ActRIIB solubles que comprenden un dominio de unión a ligando (por ejemplo, de unión a GDF8) alterado. Las trampas de GDF con dominios de unión a ligando alterados pueden comprender, por ejemplo, una o más mutaciones en residuos de aminoácido tales como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 y F101 de ActRIIB humano (la numeración es en relación con SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad aumentada para un ligando tal como GDF8/GDF11 en relación con un dominio de unión a ligando de tipo natural de un receptor ActRIIB. A modo de ilustración, en el presente documento se demuestra que estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF11 (y, por tanto, supuestamente, para GDF8) con respecto a activina: K74Y, K74F, K74I, L79D, L79E, y D80I. Las siguientes mutaciones tienen el efecto inverso, aumentando la razón de unión a activina con respecto a GDF11: D54A, K55A, L79A y F82A. La actividad de unión (a GDF11 y activina) global puede aumentarse mediante la inclusión de la región de "cola" o, supuestamente, una región de ligador no estructurado, y también mediante el uso de una mutación K74A. Otras mutaciones que provocaron una disminución global de la afinidad de unión a ligando incluyen: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80G, D80F, D80M y D80N. Las mutaciones pueden combinarse para conseguir los efectos deseados. Por ejemplo, muchas de las mutaciones que afectan a la razón de unión a GDF11:activina tienen un efecto negativo global sobre la unión al ligando y, por tanto, estas pueden combinarse con mutaciones que generalmente aumentan la unión al ligando para producir una proteína de unión mejorada con selectividad de ligando. Según la invención reivindicada, una trampa de GDF es un polipéptido de ActRIIB que comprende una mutación L79D o L79E, opcionalmente en combinación con sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos adicionales.

Opcionalmente, una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado tiene una razón de K_d para la unión a activina con respecto a K_d para la unión a GDF8 que es al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor en relación con la razón para el dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado tiene una razón de C_{l50} para inhibir activina con respecto a C_{l50} para inhibir GDF8/GDF11 que es al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor en relación con el dominio de unión a

ligando de ActRIIB de tipo natural. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8/GDF11 con una Cl_{50} al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces menor que la Cl_{50} para inhibir activina. Estas trampas de GDF pueden ser proteínas de fusión que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina (ya sea de tipo natural o mutante). En determinados casos, las trampas de GDF solubles objeto son antagonistas (inhibidores) de GDF8 y/o GDF11.

5 Se contemplan otras trampas de GDF, tales como las siguientes. Una proteína de fusión trampa de GDF que comprende una porción derivada de la secuencia de ActRIIB de SEQ ID NO: 1 ó 39 y una segunda porción de polipéptido, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 (opcionalmente que comienza en 22-25 de SEQ ID NO: 1 ó 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 1 ó 39, y en donde la proteína de fusión trampa de GDF inhibe la señalización mediante activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 (opcionalmente que comienza en 22-25 de SEQ ID NO: 1 ó 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 1 ó 39 (opcionalmente que comienza en 22-25 de SEQ ID NO: 1 ó 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-134 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-134 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La proteína de fusión trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 ó 39. Sorprendentemente, los constructos que comienzan en 22-25 de SEQ ID NO: 1 ó 39 tienen niveles de actividad mayores que las proteínas que tienen el dominio extracelular completo de ActRIIB humano. La proteína de fusión trampa de GDF puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una secuencia de aminoácidos que comienza en la posición de aminoácido 25 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en la posición de aminoácido 131 de SEQ ID NO: 1 ó 39. El polipéptido trampa de GDF puede consistir en, o consistir esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 ó 38. Cualquier de las proteínas de fusión trampa de GDF anteriores puede producirse como homodímero. Cualquier de las proteínas de fusión trampa de GDF anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc. Cualquier de las proteínas de fusión trampa de GDF anteriores puede comprender un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos adicionales en relación con SEQ ID NO: 1.

55 Se contemplan otras proteínas trampa de GDF, tales como las siguientes. Una proteína trampa de GDF que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1 ó 39, en donde la posición correspondiente a 64 de SEQ ID NO: 1 es una R o K, y en donde la proteína trampa de GDF inhibe la señalización mediante activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La proteína trampa de GDF anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 ó 39 está posicionada fuera del bolsillo de unión a ligando. La proteína trampa de GDF anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 ó 39 es una alteración conservadora posicionada dentro del bolsillo de unión a ligando. La proteína trampa de GDF anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 ó 39 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79. La proteína trampa de GDF anterior, en donde la proteína comprende al menos una secuencia N-X-S/T en una posición distinta de una secuencia N-X-S/T endógena de ActRIIB, y en una posición fuera del bolsillo de unión a ligando.

65 Se contemplan otras trampas de GDF, tales como las siguientes. Una proteína trampa de GDF que comprende una

secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1 ó 39, y en donde la proteína comprende al menos una secuencia N-X-S/T en una posición distinta de una secuencia N-X-S/T endógena de ActRIIB, y en una posición fuera del bolsillo de unión a ligando. La trampa de GDF anterior, en donde la proteína trampa de GDF comprende una N en la posición correspondiente a la posición 24 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y una S o T en la posición correspondiente a la posición 26 de SEQ ID NO: 1 ó 39, y en donde la trampa de GDF inhibe la señalización mediante activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La trampa de GDF anterior, en donde la proteína trampa de GDF comprende una R o K en la posición correspondiente a la posición 64 de SEQ ID NO: 1 ó 39. La trampa de GDF anterior, en donde la proteína de ActRIIB comprende un D o E en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y en donde la trampa de GDF inhibe la señalización mediante activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La trampa de GDF anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 ó 39 es una alteración conservadora posicionada dentro del bolsillo de unión a ligando. La trampa de GDF anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 ó 39 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79. La trampa de GDF anterior, en donde la proteína es una proteína de fusión que comprende además una porción heteróloga. Cualquiera de las proteínas de fusión trampa de GDF anteriores puede producirse como homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión trampa de GDF anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc.

20 También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertos por las reivindicaciones, ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido trampa de GDF. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante para un polipéptido trampa de GDF soluble, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica para una trampa de GDF que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, dominio de unión a ligando) de un polipéptido de ActRIIB que tiene una o más variaciones de secuencia y una secuencia que codificaría para parte o la totalidad del dominio transmembrana y/o el dominio citoplásmico de un polipéptido de ActRIIB, pero para un codón de parada posicionado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplásmico, o posicionado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o dominio citoplásmico. Por ejemplo, un polinucleótido aislado que codifica para una trampa de GDF puede comprender una secuencia de polinucleótido de ActRIIB de longitud completa tal como SEQ ID NO: 4 que tiene una o más variaciones, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo además dicho polinucleótido aislado un codón de terminación de transcripción al menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3'-terminal o por lo demás posicionado de manera que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular opcionalmente fusionado a una porción truncada de un ActRIIB de longitud completa. Los ácidos nucleicos dados a conocer en el presente documento pueden estar unidos operativamente a un promotor para su expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO.

40 También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertos por las reivindicaciones, métodos para preparar un polipéptido trampa de GDF. Un método de este tipo puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ó 31) dados a conocer en el presente documento en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Un método de este tipo puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido trampa de GDF, en donde dicha célula se transforma con un constructo de expresión de trampa de GDF; y b) recuperar el polipéptido trampa de GDF así expresado. Los polipéptidos trampa de GDF pueden recuperarse como fracciones en bruto, parcialmente purificadas o altamente purificadas usando cualquiera de las técnicas bien conocidas para obtener proteína a partir de cultivos celulares.

50 Un polipéptido trampa de GDF dado a conocer en el presente documento puede usarse en un método para fomentar la producción de glóbulos rojos o aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertos por las reivindicaciones, métodos para tratar un trastorno asociado con bajos recuentos de glóbulos rojos o bajos niveles de hemoglobina (por ejemplo, una anemia, síndrome mielodisplásico, etc.), o para fomentar la producción de glóbulos rojos, en pacientes que lo necesitan. Un método puede comprender administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de un polipéptido trampa de GDF. También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertos por las reivindicaciones, usos de polipéptidos trampa de GDF para preparar un medicamento para el tratamiento de un trastorno o una afección tal como se describe en el presente documento.

60 En parte, la divulgación demuestra que pueden usarse trampas de GDF en combinación (por ejemplo, administradas en el mismo momento o en momentos diferentes, pero generalmente de tal manera que consigan efectos farmacológicos solapantes) con activadores del receptor de EPO para aumentar los niveles de glóbulos rojos (eritropoyesis) o tratar la anemia en pacientes que lo necesitan. En parte, la divulgación demuestra que puede administrarse una trampa de GDF en combinación con un activador del receptor de EPO para aumentar sinéricamente la formación de glóbulos rojos en un paciente. Por tanto, el efecto de este tratamiento combinado puede ser significativamente mayor que la suma de los efectos de la trampa de GDF y el activador del receptor de EPO cuando se administran por separado a sus dosis respectivas. Esta sinergia puede ser ventajosa, puesto que permite que se logren niveles de glóbulos rojos diana con dosis más bajas de un activador del receptor de EPO,

evitando de ese modo los posibles efectos adversos u otros problemas asociados con niveles más altos de activación del receptor de EPO.

Un activador del receptor de EPO puede estimular la eritropoyesis mediante contacto y activación directos del receptor de EPO. El activador del receptor de EPO puede ser uno de una clase de compuestos basados en la secuencia de 165 aminoácidos de EPO nativa y generalmente conocidos como agentes estimuladores de la eritropoyesis (AEE), cuyos ejemplos son epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta, y epoetina omega. Los AEE pueden incluir proteínas EPO sintéticas (SEP) y derivados de EPO con modificaciones no peptídicas que confieren propiedades farmacocinéticas convenientes (semivida circulante prolongada), cuyos ejemplos son darbepoetina alfa y metoxipolietenglicol-epoetina beta. Un activador del receptor de EPO puede ser un agonista del receptor de EPO que no incorpora la estructura principal del polipéptido de EPO o no se clasifica generalmente como AEE. Tales agonistas del receptor de EPO pueden incluir, pero no se limitan a, miméticos peptídicos y no peptídicos de EPO, anticuerpos agonistas que seleccionan como diana el receptor de EPO, proteínas de fusión que comprenden un dominio mimético de EPO, y agonistas limitados de duración extendida del receptor de eritropoyetina (EREDLA).

Un activador del receptor de EPO puede estimular la eritropoyesis indirectamente, sin contacto con el propio receptor de EPO, mediante la potenciación de la producción de EPO endógena. Por ejemplo, los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) son estimuladores endógenos de la expresión génica de EPO que se suprimen (desestabilizan) en condiciones normóxicas mediante mecanismos reguladores celulares. En parte, puede proporcionarse una eritropoyesis aumentada en un paciente mediante tratamiento combinado con una trampa de GDF y un activador del receptor de EPO indirecto con propiedades estabilizadoras de HIF, tal como un inhibidor de prolil hidroxilasa.

También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertos por las reivindicaciones, métodos para administrar un polipéptido trampa de GDF a un paciente. En parte, la divulgación demuestra que pueden usarse polipéptidos trampa de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina. En parte, la divulgación demuestra que pueden usarse polipéptidos trampa de GDF para tratar a pacientes con eritropoyesis ineficaz y para reducir una o más afecciones asociadas con la eritropoyesis ineficaz, tales como anemia, esplenomegalia, hemocromatosis o trastornos óseos. La invención reivindicada proporciona polipéptidos trampa de GDF para su uso en el tratamiento de eritropoyesis ineficaz en un paciente con talasemia mientras se reduce la necesidad de transfusión de glóbulos rojos y se reduce la morbilidad asociada con la deposición de hierro en tejidos vulnerables. En particular, un polipéptido trampa de GDF puede usarse de este modo para tratar síndromes de β-talasemia, incluyendo β-talasemia intermedia. Los polipéptidos trampa de GDF también pueden usarse para tratar o prevenir otros usos terapéuticos tales como fomentar el crecimiento muscular. En determinados casos, cuando se administra un polipéptido trampa de GDF para fomentar el crecimiento muscular, puede ser deseable monitorizar los efectos sobre los glóbulos rojos durante la administración del polipéptido trampa de GDF, o determinar o ajustar la dosificación del polipéptido trampa de GDF, con el fin de reducir los efectos no deseados sobre los glóbulos rojos. Por ejemplo, aumentos de los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina o los niveles de hematocrito pueden provocar aumentos de la tensión arterial.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una alineación de los dominios extracelulares de ActRIIA humano (SEQ ID NO: 15) y ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2) con los residuos que se deduce en el presente documento, basándose en el análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA para entrar en contacto directo con el ligando (bolsillo de unión a ligando) indicado con los recuadros.

La figura 2 muestra una alineación de múltiples secuencias de diversas proteínas de ActRIIB de vertebrados y ActRIIA humano (SEQ ID NO: 16-23).

La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos completa para la trampa de GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 11), que incluye la secuencia líder de TPA (dblemente subrayada), el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 20-134 en SEQ ID NO: 1; subrayado), y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, como lo está la glicina revelada mediante secuenciación que es el residuo en el extremo N-terminal de la proteína madura.

La figura 4 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica para ActRIIB(L79D 20-134)-hFc. SEQ ID NO: 25 corresponde a la cadena sentido, y SEQ ID NO: 33 corresponde a la cadena antisentido. El líder de TPA (nucleótidos 1-66) está doblemente subrayado, y el dominio extracelular de ActRIIB (nucleótidos 76-420) está subrayado.

La figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos completa para la trampa de GDF truncada ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (SEQ ID NO: 26), que incluye el líder de TPA (doblemente subrayado), el dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1; subrayado), y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, como lo está el glutamato revelado mediante secuenciación que es el residuo en el extremo N-terminal de la proteína madura.

- 5 La figura 6 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica para ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 27 corresponde a la cadena sentido, y SEQ ID NO: 34 corresponde a la cadena antisentido. El líder de TPA (nucleótidos 1-66) está doblemente subrayado, y el dominio extracelular de ActRIIB truncado (nucleótidos 76-396) está subrayado. También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1).
- 10 La figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos para la trampa de GDF truncada ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sin ninguno líder (SEQ ID NO: 28). El dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1) está subrayado. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, como lo está el glutamato revelado mediante secuenciación que es el residuo en el extremo N-terminal de la proteína de fusión madura.
- 15 La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos para la trampa de GDF truncada ActRIIB(L79D 25-131) sin el líder, el dominio hFc, ni el ligador (SEQ ID NO: 29). El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está subrayado y resaltado, como lo está el glutamato revelado mediante secuenciación que es el residuo en el extremo N-terminal de la proteína de fusión madura.
- 20 La figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica para ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 30 corresponde a la cadena sentido y SEQ ID NO: 35 corresponde a la cadena antisentido. El líder de TPA (nucleótidos 1-66) está doblemente subrayado, el dominio extracelular de ActRIIB truncado (nucleótidos 76-396) está subrayado, y las sustituciones en la secuencia de nucleótidos de tipo natural del dominio extracelular están doblemente subrayadas y resaltadas (compárese con SEQ ID NO: 27, figura 6). También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1).
- 25 La figura 10 muestra los nucleótidos 76-396 (SEQ ID NO: 31) de la secuencia de nucleótidos alternativa mostrada en la figura 9 (SEQ ID NO: 30). Las mismas sustituciones de nucleótidos indicadas en la figura 9 también están subrayadas y resaltadas en este caso. SEQ ID NO: 31 codifica sólo para el dominio extracelular de ActRIIB truncado (correspondiente a los residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1) con una sustitución L79D, por ejemplo, ActRIIB(L79D 25-131).
- 30 La figura 11 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre la concentración de hemoglobina en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia. Los datos son medias ± EEM. **, P < 0,01 frente a paclitaxel en el mismo punto de tiempo. Esta trampa de GDF compensa la anemia inducida por el tratamiento con paclitaxel.
- 35 La figura 12 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre los niveles de glóbulos rojos (RBC) en un modelo de ratón sometido a nefrectomía unilateral (NEPHX) de enfermedad renal crónica. Los datos son medias ± EEM. ***, P < 0,001 frente a nivel inicial. Esta trampa de GDF revirtió la anemia inducida por nefrectomía observada en ratones de control.
- 40 La figura 13 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre los niveles de glóbulos rojos (RBC), hemoglobina (HGB) y hematocrito (HCT) en un modelo de ratón sometido a nefrectomía unilateral (NEPHX) de enfermedad renal crónica. Los datos son cambios medios con respecto al nivel inicial a lo largo de 4 semanas (± EEM). *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001 frente a controles NEPHX. Esta trampa de GDF previno la disminución asociada a la nefrectomía en estos parámetros eritrocíticos, que aumentaron, cada uno de ellos, en una magnitud similar a la de ratones con riñones intactos (simulados).
- 45 La figura 14 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre los niveles de glóbulos rojos (RBC) en un modelo de rata de anemia inducida por pérdida de sangre aguda. La extracción de sangre se produjo el día -1, con dosificación los días 0 y 3. Los datos son medias ± EEM. **, P < 0,01; ***, P < 0,001 frente a vehículo en el mismo punto de tiempo. Esta trampa de GDF mejoró la tasa y el grado de recuperación de la anemia inducida por pérdida de sangre.
- 50 La figura 15 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (negro) sobre el cambio absoluto en la concentración de glóbulos rojos con respecto al nivel inicial en macaco cangrejero. VEH = vehículo. Los datos son medias ± EEM. n = 4-8 por grupo.
- 55 La figura 16 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (negro) sobre el cambio absoluto en el hematocrito con respecto al nivel inicial en macaco cangrejero. VEH = vehículo. Los datos son medias ± EEM. n = 4-8 por grupo.
- 60 La figura 17 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (negro) sobre el cambio absoluto en la concentración de hemoglobina con respecto al nivel inicial en macaco cangrejero. VEH = vehículo. Los datos son medias ± EEM. n = 4-8 por grupo.
- 65 La figura 18 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc

(negro) sobre el cambio absoluto en la concentración de reticulocitos circulantes con respecto al nivel inicial en macaco cangrejero. VEH = vehículo. Los datos son medias ± EEM. n = 4-8 por grupo.

5 La figura 19 muestra el efecto del tratamiento combinado con eritropoyetina (EPO) y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc durante 72 horas sobre el hematocrito en ratones. Los datos son medias ± EEM (n = 4 por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$, prueba de la t para datos independientes) están designadas mediante letras diferentes. El tratamiento combinado aumentó el hematocrito en un 23 % en comparación con el vehículo, un aumento sinérgico mayor que la suma de los efectos independientes de EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc.

10 La figura 20 muestra el efecto del tratamiento combinado con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc durante 72 horas sobre las concentraciones de hemoglobina en ratones. Los datos son medias ± EEM (n = 4 por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) están designadas mediante letras diferentes. El tratamiento combinado aumentó las concentraciones de hemoglobina en un 23 % en comparación con el vehículo, que también fue un efecto sinérgico.

15 La figura 21 muestra el efecto del tratamiento combinado con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc durante 72 horas sobre las concentraciones de glóbulos rojos en ratones. Los datos son medias ± EEM (n = 4 por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$) están designadas mediante letras diferentes. El tratamiento combinado aumentó las concentraciones de glóbulos rojos en un 20 % en comparación con el vehículo, que también fue un efecto sinérgico.

20 La figura 22 muestra el efecto del tratamiento combinado con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc durante 72 horas sobre los números de células precursoras eritropoyéticas en bazo de ratón. Los datos son medias ± EEM (n = 4 por grupo), y las medias que son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,01$) están designadas mediante letras diferentes. Mientras que EPO sola aumentó el número de eritroblastos basófilos (BasoE) drásticamente a expensas de la maduración de precursores en etapa tardía, el tratamiento combinado aumentó los números de BasoE en menor medida pero todavía significativa mientras que respaldaba la maduración no disminuida de precursores en etapa tardía.

25 La figura 23 compara los parámetros de RBC en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de β-talasemia con los de ratones de tipo natural (WT). Se analizaron muestras de sangre de ratones no tratados a los 2-6 meses de edad para determinar el número de glóbulos rojos (RBC; A), el hematocrito (HCT; B), y la concentración de hemoglobina (Hgb; C). Los datos son medias ± EEM (n = 4 por grupo), ***, $p < 0,001$. Se confirmó que los ratones $Hbb^{-/-}$ eran gravemente anémicos.

30 La figura 24 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc sobre el número de RBC en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de β-talasemia. Se extrajeron muestras de sangre después de 4 semanas de tratamiento. Los datos son medias de 2 por grupo, indicando las barras el intervalo. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo a la mitad el déficit de RBC presente en ratones $Hbb^{-/-}$.

35 La figura 25 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc sobre la morfología de RBC en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de β-talasemia. Se obtuvieron imágenes de frotis de sangre teñidos con Giemsa de ratones tratados durante 4 semanas a un aumento de 100x. Obsérvese la hemólisis, el residuo celular, y muchos RBC pequeños o con forma irregular en la sangre del ratón $Hbb^{-/-}$ tratado con vehículo. A modo de comparación, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo en gran medida la hemólisis, el residuo, y la aparición de RBC con forma irregular mientras que aumentó el número de RBC con forma normal.

40 La figura 26 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 2 meses sobre el número de RBC en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de β-talasemia, incluyendo datos de ratones de tipo natural dosificados con vehículo para la comparación. Los datos son medias ± EEM; n = 7 por grupo. **, $P < 0,01$ frente a ratones $Hbb^{-/-}$ tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo el déficit de RBC medio en ratones $Hbb^{-/-}$ en más del 50 %.

45 La figura 27 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 2 meses sobre los niveles de bilirrubina sérica en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de β-talasemia, incluyendo datos de ratones de tipo natural dosificados con vehículo para la comparación. Los datos son medias ± EEM. ####, $P < 0,001$ frente a ratones de tipo natural tratados con vehículo; *, $P < 0,05$ frente a ratones $Hbb^{-/-}$ tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo significativamente los niveles de bilirrubina total en ratones $Hbb^{-/-}$.

50 La figura 28 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 2 meses sobre el nivel de EPO sérica en un modelo de ratón $Hbb^{-/-}$ de β-talasemia, incluyendo datos de ratones de tipo natural dosificados con vehículo para la comparación. Los datos son medias ± EEM. ####, $P < 0,001$ frente a ratones de tipo natural tratados con vehículo; *, $P < 0,05$ frente a ratones $Hbb^{-/-}$ tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo los niveles medios de EPO circulante en más del 60 % en ratones $Hbb^{-/-}$.

La figura 29 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc sobre la esplenomegalia en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de β-talasemia, incluyendo datos de ratones de tipo natural dosificados con vehículo para la comparación. A. Medias ± EEM de ratones comenzando a los 3 meses de edad después del tratamiento con 1 mg/kg dos veces a la semana durante 2 meses. ###, P < 0,001 frente a ratones de tipo natural tratados con vehículo; *, P < 0,05 frente a ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo. B. Tamaños representativos del bazo, tal como se observaron en un estudio independiente en ratones comenzando a los 6-8 meses de edad después del tratamiento con 1 mg/kg dos veces a la semana durante 3 meses. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo significativamente el peso del bazo en ratones *Hbb^{-/-}*.

10 La figura 30 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 2 meses sobre la densidad mineral ósea en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de β-talasemia, incluyendo datos de ratones de tipo natural dosificados con vehículo para la comparación. Medias ± EEM basadas en el análisis del fémur. #, P < 0,05 frente a ratones de tipo natural tratados con vehículo; *, P < 0,05 frente a ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc normalizó la densidad mineral ósea en ratones *Hbb^{-/-}*.

15 La figura 31 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 2 meses sobre los parámetros de homeostasis de hierro en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de β-talasemia. Medias ± EEM para hierro sérico (A), ferritina sérica (B), y saturación de transferrina (C). *, P < 0,05; **, P < 0,01 frente a ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo significativamente cada medida de hemocromatosis en ratones *Hbb^{-/-}*.

20 La figura 32 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 2 meses sobre la hemocromatosis tisular en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de β-talasemia. Se determinaron los niveles de hierro en cortes tisulares (200 μm) de bazo (A-C), hígado (D-F), y riñón (G-I) mediante tinción con azul de Prusia de Perls. La tinción de hierro en el bazo de tipo natural (A) fue abundante en pulpa roja (flechas), pero estaba ausente en pulpa blanca (*). Una tinción de hierro aumentada en el bazo de ratones *Hbb^{-/-}* (B) refleja la expansión de las regiones de pulpa roja debido a la eritropoyesis extramedular. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc en ratones *Hbb^{-/-}* disminuyó la eritropoyesis esplénica y restableció el patrón de tipo natural de la tinción de hierro esplénico (C). Además, la tinción de hierro anómala en células de Kupffer hepáticas (H, flechas) y corteza renal (E, flechas) de ratones *Hbb^{-/-}* se normalizó mediante ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (F e I). Aumento, 200x.

25 La figura 33 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 2 meses sobre los niveles hepáticos de ARNm de hepcidina en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de β-talasemia. Medias ± EEM; *, P < 0,05 frente a ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc aumentó significativamente la expresión de ARNm de hepcidina en ratones *Hbb^{-/-}*.

30 La figura 34 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc sobre los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) circulantes en un modelo de ratón *Hbb^{-/-}* de β-talasemia, incluyendo datos de ratones de tipo natural dosificados con vehículo para la comparación. Los datos son medias geométricas ± EEM. ###, P < 0,001 frente a ratones de tipo natural tratados con vehículo; ***, P < 0,001 frente a ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo significativamente las ROS en ratones *Hbb^{-/-}*.

Descripción detallada

45 1. Visión general

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos sobre una gran variedad de tipos de células tanto en vertebrados como en invertebrados.

50 Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejidos y pueden influir en una variedad de procesos de diferenciación, incluyendo adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis, y diferenciación de células epiteliales. Al manipular la actividad de un miembro de la familia de TGF-beta, a menudo es posible provocar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado vacuno piamontesa y azul belga portan una mutación de pérdida de función en el gen de GDF8 (también denominado miostatina) que provoca un notable aumento de la masa muscular. Grobet *et al.*, Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Además, en seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 están asociados con una masa muscular aumentada y, según se notifica, una fuerza excepcional. Schuelke *et al.*, N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

55 60 Las señales de TGF-β están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina cinasa de tipo I y tipo II, que fosforilan y activan las proteínas Smad aguas abajo tras la estimulación del ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Estos receptores de tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásico con especificidad para serina/treonina predicha. Los receptores de tipo I son esenciales para la señalización. Se requieren los receptores de tipo II para la unión de ligandos y para la expresión de los receptores

de tipo I. Los receptores de activina de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión al ligando, dando como resultado la fosforilación de los receptores de tipo I mediante los receptores de tipo II.

Se han identificado dos receptores de tipo II (ActRII) relacionados, ActRIIA y ActRIIB, como receptores de tipo II para las activinas (Mathews y Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano *et al.*, 1992, Cell 68: 97-108). Además de activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interaccionar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia de TGF- β , incluyendo BMP7, Nodal, GDF8, y GDF11 (Yamashita *et al.*, 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee y McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo y Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh *et al.*, 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 es el principal receptor de tipo I para las activinas, particularmente para la activina A, y ALK-7 también puede servir como receptor para las activinas, particularmente para la activina B. La presente invención se refiere a antagonizar un ligando de receptores ActRIIB (también denominado ligando de ActRIIB) con un polipéptido trampa de GDF objeto. Los ligandos de receptores ActRIIB a modo de ejemplo incluyen algunos miembros de la familia de TGF- β , tales como activina A, activina B, Nodal, GDF8, GDF11, y BMP7.

Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos diméricos que pertenecen a la superfamilia de TGF-beta. Hay tres formas principales de activina (A, B, y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, y $\beta_A\beta_B$, respectivamente). El genoma humano también codifica para una activina C y una activina E, que se expresan principalmente en el hígado, y también se conocen formas heterodiméricas que contienen β_C o β_E . En la superfamilia de TGF-beta, las activinas son factores singulares y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en células ováricas y placentarias, respaldar la supervivencia de células neuronales, influir en el progreso del ciclo celular de manera positiva o negativa dependiendo del tipo de célula, e inducir diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibios (DePaolo *et al.*, 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson *et al.*, 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Además, se halló que el factor de diferenciación eritroide (EDF) aislado de células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idéntico a la activina A (Murata *et al.*, 1988, PNAS, 85:2434). Se ha sugerido que la activina A fomenta la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina está antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de hormona foliculoestimulante (FSH) a partir de la hipófisis, la activina fomenta la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina previene la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a la activina incluyen folistatina (FS), proteína relacionada con la folistatina (FSRP) y α_2 -macroglobulina.

Las proteínas Nodal tienen funciones en la inducción y formación de mesodermo y endodermo, así como en la posterior organización de estructuras axiales tales como el corazón y el estómago en la embriogénesis temprana. Se ha demostrado que el tejido dorsal en un embrión de vertebrado en desarrollo contribuye predominantemente a las estructuras axiales de la placa notocordal y precordal mientras recluta células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Parece que Nodal señaliza a través de receptores tanto de tipo I como de tipo II y efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. Estudios recientes respaldan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para Nodal (Sakuma *et al.*, Genes Cells. 2002, 7:401-12). Se sugiere que los ligandos de Nodal interactúan con sus cofactores (por ejemplo, Cripto) para activar los receptores de activina de tipo I y tipo II, que fosforilan Smad2. Las proteínas Nodal están implicadas en muchos acontecimientos críticos para el embrión temprano de vertebrados, incluyendo la formación de mesodermo, la formación de patrón anterior, y la especificación del eje izquierda-derecha. Evidencias experimentales han demostrado que la señalización de Nodal activa pAR3-Lux, un indicador de luciferasa que se ha demostrado previamente que responde específicamente a activina y TGF-beta. Sin embargo, Nodal es incapaz de inducir pTlx2-Lux, un indicador que responde específicamente a proteínas morfogenéticas óseas. Resultados recientes proporcionan evidencias bioquímicas directas de que la señalización de Nodal está mediada por ambas Smad de la ruta activina-TGF-beta, Smad2 y Smad3. Evidencias adicionales han demostrado que se requiere la proteína Cripto extracelular para la señalización de Nodal, lo que la hace distinta de la señalización de activina o TGF-beta.

El factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF8) también se conoce como miostatina. GDF8 es un regulador negativo de la masa musculoesquelética. GDF8 tiene una alta expresión en el músculo esquelético en desarrollo y adulto. La mutación anuladora de GDF8 en ratones transgénicos se caracteriza por una notable hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético (McPherron *et al.*, Nature, 1997, 387:83-90). Son evidentes aumentos similares de la masa musculoesquelética en mutaciones que se producen de manera natural de GDF8 en ganado vacuno (Ashmore *et al.*, 1974, Growth, 38:501-507; Swatland y Kieffer, J. Anim. Sci., 1994, 38:752-757; McPherron y Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94:12457-12461; y Kambadur *et al.*, Genome Res., 1997, 7:910-915) y, sorprendentemente, en seres humanos (Schuelke *et al.*, N Engl J Med 2004;350:2682-8). Los estudios también han demostrado que la atrofia muscular asociada con la infección por VIH en seres humanos está acompañada de aumentos de la expresión de la proteína GDF8 (González-Cadavid *et al.*, PNAS, 1998, 95:14938-43). Además, GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas de músculo (por ejemplo, creatina cinasa) y modular la proliferación de mioblastos (documento WO 00/43781). El propéptido de GDF8 puede unirse de manera no covalente al dímero de dominio de GDF8 maduro, inactivando su actividad biológica (Miyazono *et al.* (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield *et al.* (1988) J. Biol. Chem., 263: 7646-7654; y Brown *et al.* (1990) Growth Factors, 3: 35-43). Otras proteínas que se unen a GDF8 o proteínas estructuralmente relacionadas e inhiben su

actividad biológica incluyen folistatina y, posiblemente, proteínas relacionadas con la folistatina (Gamer *et al.* (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

- 5 El factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada (McPherron *et al.*, 1999, Nat. Genet. 22: 260-264). GDF11 se expresa en la yema de la cola, la yema de las extremidades, los arcos maxilar y mandibular, y los ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Nakashima *et al.*, 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). GDF11 desempeña un papel singular en la formación de patrón en tejidos tanto mesodérmicos como neurales (Gamer *et al.*, 1999, Dev Biol., 208:222-32). Se demostró que GDF11 es un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en extremidades de pollo en desarrollo (Gamer *et al.*, 10 2001, Dev Biol. 229:407-20). La expresión de GDF11 en músculo también sugiere su papel en la regulación del crecimiento muscular de manera similar a GDF8. Además, la expresión de GDF11 en cerebro sugiere que GDF11 también puede presentar actividades relacionadas con la función del sistema nervioso. Curiosamente, se halló que GDF11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wu *et al.*, 2003, Neuron. 37:197-207).
- 15 15 Se sabe bien que la proteína morfogenética ósea (BMP7), también denominada proteína osteogénica 1 (OP-1), induce la formación de cartílago y hueso. Además, BMP7 regula una amplia gama de procesos fisiológicos. Por ejemplo, BMP7 puede ser el factor osteoinductor responsable del fenómeno de osteogénesis epitelial. También se encuentra que BMP7 desempeña un papel en la regulación de calcio y la homeostasis ósea. Al igual que la activina, BMP7 se une a los receptores de tipo II, ActRIIA y ActRIIB. Sin embargo, BMP7 y activina reclutan receptores de tipo I distintos en complejos de receptores heteroméricos. El principal receptor de tipo I de BMP7 observado fue ALK2, mientras que la activina se unió exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). BMP7 y activina provocaron respuestas biológicas distintas y activaron rutas de Smad diferentes (Macías-Silva *et al.*, 1998, J Biol Chem. 273:25628-36).
- 20 25 Tal como se demuestra en el presente documento, un polipéptido trampa de GDF, que es un polipéptido de ActRIIB variante (ActRIIB), es más eficaz para aumentar los niveles de glóbulos rojos *in vivo* en comparación con un polipéptido de ActRIIB soluble de tipo natural y tiene efectos beneficiosos en una variedad de modelos para anemias y eritropoyesis ineficaz. Adicionalmente, se demuestra que el uso de un polipéptido trampa de GDF en combinación con un activador del receptor de EPO provoca un aumento sustancial de la formación de glóbulos rojos. Cabe señalar que la hematopoyesis es un proceso complejo, regulado por una variedad de factores, incluyendo la homeostasis de hierro, G-CSF y eritropoyetina. Las expresiones "aumentar los niveles de glóbulos rojos" y "fomentar la formación de glóbulos rojos" se refieren a parámetros clínicamente observables, tales como hematocrito, recuentos de glóbulos rojos y mediciones de hemoglobina, y se pretende que sean neutros en cuanto al mecanismo por el cual se producen tales cambios.
- 30 35 40 45 50 55 60 65 Los efectos de EPO están mediados a través de su unión a, y activación de, un receptor de superficie celular perteneciente a la super familia de receptores de citocinas y designado como receptor de EPO. Los receptores de EPO humanos y murinos se han clonado y expresado (D'Andrea *et al.*, 1989, Cell 57:277; Jones *et al.*, 1990, Blood 76:31; Winkelmann *et al.*, 1990, Blood 76:24; documento WO 90/08822/patente estadounidense n.º 5.278.065). El gen del receptor de EPO humano codifica para una proteína transmembrana de 483 aminoácidos que comprende un dominio extracelular de aproximadamente 224 aminoácidos y presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 82 % con el receptor de EPO murino (véase la patente estadounidense n.º 6.319.499). El receptor de EPO de longitud completa clonado expresado en células de mamífero (66-72 kDa) se une a EPO con una afinidad ($K_D = 100-300$ nM) similar a la del receptor nativo en células progenitoras eritroides. Por tanto, se piensa que esta forma contiene el principal determinante de unión a EPO y se denomina receptor de EPO. Por analogía con otros receptores de citocinas estrechamente relacionados, se piensa que el receptor de EPO se dimeriza tras la unión al agonista. No obstante, la estructura detallada del receptor de EPO, que puede ser un
- La EPO es una hormona glicoproteica implicada en el crecimiento y la maduración de células progenitoras eritroides en eritrocitos. La EPO se produce por el hígado durante la vida fetal y por el riñón en adultos. Una producción disminuida de EPO, que se produce habitualmente en adultos como consecuencia de insuficiencia renal, conduce a anemia. La EPO se ha producido mediante técnicas de ingeniería genética basándose en la expresión y secreción de la proteína a partir de una célula huésped transfectada con el gen de EPO. La administración de tal EPO recombinante ha sido eficaz en el tratamiento de anemia. Por ejemplo, Eschbach *et al.* (1987, N Engl J Med 316:73) describen el uso de EPO para corregir la anemia provocada por insuficiencia renal crónica.
- La EPO es una hormona glicoproteica implicada en el crecimiento y la maduración de células progenitoras eritroides en eritrocitos. La EPO se produce por el hígado durante la vida fetal y por el riñón en adultos. Una producción disminuida de EPO, que se produce habitualmente en adultos como consecuencia de insuficiencia renal, conduce a anemia. La EPO se ha producido mediante técnicas de ingeniería genética basándose en la expresión y secreción de la proteína a partir de una célula huésped transfectada con el gen de EPO. La administración de tal EPO recombinante ha sido eficaz en el tratamiento de anemia. Por ejemplo, Eschbach *et al.* (1987, N Engl J Med 316:73) describen el uso de EPO para corregir la anemia provocada por insuficiencia renal crónica.

complejo multimérico, y su mecanismo de activación específico no se entienden completamente (patente estadounidense n.º 6.319.499).

- 5 La activación del receptor de EPO da como resultado varios efectos biológicos. Estos incluyen una proliferación aumentada de eritroblastos inmaduros, una diferenciación aumentada de eritroblastos inmaduros, y una apoptosis disminuida en células progenitoras eritroides (Liboi *et al.*, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury *et al.*, 1990, Science 248:378-381). Parece que las rutas de transducción de señales del receptor de EPO que median la proliferación y diferenciación son distintas (Noguchi *et al.*, 1988, Mol Cell Biol 8:2604; Patel *et al.*, 1992, J Biol Chem 1992, 267:21300; Liboi *et al.*, *ibid*). Algunos resultados sugieren que puede requerirse una proteína secundaria para la mediación de la señal de diferenciación (Chiba *et al.*, 1993, Nature 362:646; Chiba *et al.*, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11593); sin embargo, hay controversia en cuanto al papel de las proteínas secundarias en la diferenciación puesto que una forma constitutivamente activada del receptor puede estimular tanto la proliferación como la diferenciación (Pharr *et al.*, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:938).
- 10 15 Los activadores del receptor de EPO incluyen agentes estimuladores de la eritropoyesis (AEE) de molécula pequeña, así como compuestos basados en EPO. Un ejemplo de los primeros es un agonista basado en péptido dimérico unido de manera covalente a polietilenglicol (marca comercial Hematide), que ha demostrado propiedades estimuladoras de la eritropoyesis en voluntarios sanos y en pacientes tanto con enfermedad renal crónica como con anticuerpos anti-EPO endógenos (Stead *et al.*, 2006, Blood 108:1830-1834; Macdougall *et al.*, 2009, N Engl J Med 361:1848-1855). Otros ejemplos incluyen AEE no basados en péptidos (Qureshi *et al.*, 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:12156-12161).
- 20 25 Los activadores del receptor de EPO también incluyen compuestos que estimulan la eritropoyesis indirectamente, sin contacto con el propio receptor de EPO, mediante la potenciación de la producción de EPO endógena. Por ejemplo, los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) son estimuladores endógenos de la expresión génica de EPO que se suprime (desestabilizan) en condiciones normóxicas mediante mecanismos reguladores celulares. Por tanto, están investigándose inhibidores de enzimas prolil hidroxilasas de HIF para determinar la actividad inductora de EPO *in vivo*. Otros activadores del receptor de EPO indirectos incluyen inhibidores del factor de transcripción GATA-2 (Nakano *et al.*, 2004, Blood 104:4300-4307), que inhiben tópicamente la expresión génica de EPO, e inhibidores de fosfatasa de células hematopoyéticas (HCP o SHP-1), que funcionan como regulador negativo de la transducción de señales del receptor de EPO (Klingmuller *et al.*, 1995, Cell 80:729-738).
- 30 35 Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Determinados términos se comentan a continuación o en otras partes en la memoria descriptiva para proporcionar una guía adicional al experto para describir las composiciones y los métodos de la invención y cómo prepararlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término resultará evidente a partir del contexto específico en el que se usa el término.
- 40 45 50 Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Determinados términos se comentan a continuación o en otras partes en la memoria descriptiva para proporcionar una guía adicional al experto para describir las composiciones y los métodos de la invención y cómo prepararlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término resultará evidente a partir del contexto específico en el que se usa el término.
- 55 60 Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Determinados términos se comentan a continuación o en otras partes en la memoria descriptiva para proporcionar una guía adicional al experto para describir las composiciones y los métodos de la invención y cómo prepararlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término resultará evidente a partir del contexto específico en el que se usa el término.
- 65 65 El término "similitud de secuencia", en todas sus formas gramaticales, se refiere al grado de identidad o

correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos que pueden compartir un origen evolutivo común o no.

5 Sin embargo, en el uso habitual y en la presente solicitud, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio tal como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia y puede estar relacionado con un origen evolutivo común o no.

2. Polipéptidos trampa de GDF

10 La divulgación se refiere generalmente a polipéptidos trampa de GDF, por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB variantes solubles, incluyendo, por ejemplo, fragmentos, variantes funcionales, y formas modificadas de polipéptidos de ActRIIB. Sin embargo, se entiende que la invención reivindicada sólo cubre tales polipéptidos tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas para los usos médicos reivindicados. Los polipéptidos trampa de GDF pueden tener al menos una actividad biológica similar o igual a un polipéptido de ActRIIB de tipo natural correspondiente. Por ejemplo, un polipéptido trampa de GDF de la invención puede unirse a, e inhibir la función de, un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Opcionalmente, un polipéptido trampa de GDF aumenta los niveles de glóbulos rojos. Los ejemplos de polipéptidos trampa de GDF incluyen polipéptidos precursores de ActRIIB humano (SEQ ID NO: 1 ó 39) que tienen una o más variaciones de secuencia, y polipéptidos de ActRIIB humano solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41) que tienen una o más variaciones de secuencia.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina de tipo IIb (ActRIIB) de cualquier especie y a variantes derivadas de tales proteínas de ActRIIB mediante mutagénesis u otra modificación. Se entiende que la referencia a ActRIIB en el presente documento es una referencia a una cualquiera de las formas identificadas actualmente. Los miembros de la familia de ActRIIB son generalmente proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico con actividad serina/treonina cinasa predicha. En la figura 1 se ilustran secuencias de aminoácidos del dominio extracelular soluble de ActRIIA humano (proporcionado a modo de comparación) y del dominio extracelular soluble de ActRIIB.

20 30 35 40 El término "polipéptido de ActRIIB" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido que se produce de manera natural de un miembro de la familia de ActRIIB, así como cualquier variante de los mismos (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones, y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Véase, por ejemplo, el documento WO 2006/012627. Por ejemplo, los polipéptidos de ActRIIB incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIB conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente el 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de ActRIIB, y opcionalmente una identidad de al menos el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o mayor. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIB puede unirse a, e inhibir la función de, una proteína de ActRIIB y/o activina. Un polipéptido de ActRIIB que es una trampa de GDF puede seleccionarse por su actividad para fomentar la formación de glóbulos rojos *in vivo*. Los ejemplos de polipéptidos de ActRIIB incluyen polipéptido precursor de ActRIIB humano (SEQ ID NO: 1 y 39) y polipéptidos de ActRIIB humano solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41). La numeración de aminoácidos para todos los polipéptidos relacionados con ActRIIB descritos en el presente documento se basa en la numeración para SEQ ID NO: 1, a menos que se designe específicamente lo contrario.

45 La secuencia de proteína precursora de ActRIIB humano es tal como sigue:

```

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAE TRECIYYNANWE LERTNQSGLERC
EGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTLTVLAYSLLPIG
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETM
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIARDFKSKNVLLKSDLTAVIADFGLA
VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKMRPTIK
DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 1)

```

El péptido señal está subrayado; el dominio extracelular está en negrita y los posibles sitios de glicosilación ligada a N están en recuadros.

También se notifica en la bibliografía una forma con una alanina en la posición 64, tal como sigue:

5

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAE TRECIYYNANWEERT**N**QSGLERC**
EGEQDKRLHCYASWAN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWSEREIFSTPGMKHENLL
QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETM
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFSKNVLLKSDLTAVLADFLA
VRFEPGKPPGDTHQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKMRPTIK
DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 39)

La secuencia de polipéptido procesado soluble (extracelular) de ActRIIB humano es tal como sigue:

GRGEAE**TRECIYYNANWEERT**NQSGLERCE**GEQDKRLHCYASWRN**SSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 2)

10

La forma alternativa con una A64 es tal como sigue:

GRGEAE**TRECIYYNANWEERT**NQSGLERCE**GEQDKRLHCYASWA**NSSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 40)

15

En algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia "SGR..." en el extremo N-terminal. La "cola" C-terminal del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" deletionada (una secuencia Δ15) es tal como sigue:

GRGEAE**TRECIYYNANWEERT**NQSGLERCE**GEQDKRLHCYASWRN**SSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EA (SEQ ID NO: 3)

20

La forma alternativa con una A64 es tal como sigue:

GRGEAE**TRECIYYNANWEERT**NQSGLERCE**GEQDKRLHCYASWA**NSSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EA (SEQ ID NO: 41)

25

En algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia "SGR..." en el extremo N-terminal. La secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína precursora de ActRIIB humano es tal como sigue: (nucleótidos 5-1543 del registro de Genbank NM_001106) (la secuencia tal como se muestra proporciona una alanina en la posición 64, y puede modificarse para proporcionar una arginina en su lugar)

30

ATGACGGC GCCCTGGGTGGCCCTGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
 CCGGCTCTGGCGTGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
 CGCCA ACTGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCCTGGAGCGCTGC
 GAAGGCAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAA
 GCTCTGGCACCATCGAGCTGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
 CAACTGCTACGATAGGCAGGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
 GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
 ATTGCCAGAGGCTGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC
 AGCCCCCACCCCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCATCGGG
 GCCCTTCCCTCATCGTCTGCTGGCCTTTGGATGTACCGGCATCGCA
 AGCCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCCTGGGCCTCCACC
 ACCATCCCCCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
 GCTGGGGCGCTTGGCTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
 TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCCTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
 TGAACGGGAGATCTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
 CAGTTCATGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCAAACCTCGAAGTAGAGCTGT
 GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
 GGGAACATCATCACATGGAACGAACTGTGTATGAGCAGAGACGATG
 TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCG
 AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTAAAAGTAAGAATGT
 ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTGGCTGGCT
 GTTCGATTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGACACCCACGGACAGGTAG
 GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGTTGGT
 CCAGAGAGATGCCCTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGTTGGT
 CTGTGGGAGCTTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
 AGTACATGCTGCCCTTGAGGAAGAGATTGCCAGCACCCTCGTTGGA
 GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTCACAAGAAGATGAGGCCACCATTAAA
 GATCACTGGTGAAACACCCGGCCTGGCCAGCTTGTGTGACCATCG
 AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAAGAGCTCGTTGTCGGCAGGCTGT
 GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTGGAGGTGGTCAACGGCACTACCTCG
 GACTGTCTCGTTCCCTGGTGACCTCTGTCACCAATGTGGACCTGCC
 CTAAGAGTCAGCATCTAA (SEQ ID NO: 4)

- 5 La secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido soluble (extracelular) de ActRIIB humano es tal como sigue (la secuencia tal como se muestra proporciona una alanina en la posición 64, y puede modificarse para proporcionar una arginina en su lugar):

```

GGCGTGGGAGGCTGAGACACGGAGTCATCTACTACAACGCCA
GGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCTGGAGCGCTGC
GAAGGCAGCAGCAAGCGCTGCACGTGCTACGCCTCCTGG
GCCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTG
CTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGT
GAGGAGAACCCCCCAGGTGTACTCTGCTGCTGAAGGCAAC
TTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTGCCAGGGCTGGGCCC
GGAAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCA

```

CC (SEQ ID NO: 5)

- Los polipéptidos trampa de GDF pueden ser formas variantes de polipéptidos de ActRIIB solubles. Tal como se describe en el presente documento, el término "polipéptido de ActRIIB soluble" se refiere generalmente a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína de ActRIIB. El término "polipéptido de ActRIIB soluble", tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier dominio extracelular que se produce de manera natural de una proteína de ActRIIB, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína de ActRIIB se une a un ligando y es generalmente soluble. Los ejemplos de polipéptidos de ActRIIB solubles incluyen polipéptidos de ActRIIB solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41). Otros ejemplos de polipéptidos de ActRIIB solubles comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína de ActRIIB, véase el ejemplo 1. La secuencia señal puede ser una secuencia señal nativa de un ActRIIB, o una secuencia señal de otra proteína, tal como una secuencia señal de activador tisular del plasminógeno (TPA) o una secuencia señal de melitina de abeja melifera (HBM).
- La divulgación identifica variantes y porciones funcionalmente activas de ActRIIB. Los solicitantes han determinado que una proteína de fusión Fc que tiene la secuencia dada a conocer por Hilden *et al.* (Blood. 15 de abril de 1994;83(8):2163-70), que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de SEQ ID NO: 1 (A64), tiene una afinidad relativamente baja por activina y GDF-11. En cambio, la misma proteína de fusión Fc con una arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad por activina y GDF-11 en el intervalo de nanomolar bajo a picomolar alto. Por tanto, en esta divulgación se usa una secuencia con una R64 como secuencia de referencia de tipo natural para ActRIIB humano.
- Attisano *et al.* (Cell. 10 de enero de 1992;68(1):97-108) demostraron que una delección del nudo de prolina en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB redujo la afinidad del receptor por activina. Una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de SEQ ID NO: 1, "ActRIIB(20-119)-Fc", tiene una unión a GDF-11 y activina reducida en relación con ActRIIB(20-134)-Fc, que incluye la región de nudo de prolina y el dominio yuxtapamembrana completo. Sin embargo, una proteína de ActRIIB(20-129)-Fc conserva una actividad similar pero algo reducida en relación con el tipo natural, incluso aunque la región de nudo de prolina esté alterada. Por tanto, se espera que todos los dominios extracelulares de ActRIIB que se detienen en el aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 y 129 sean activos, pero los constructos que se detienen en 134 ó 133 pueden ser los más activos. De manera similar, no se espera que las mutaciones en cualquiera de los residuos 129-134 alteren la afinidad de unión a ligando en grandes márgenes. Para respaldar esto, las mutaciones P129 y P130 no disminuyen sustancialmente la unión al ligando. Por tanto, un polipéptido trampa de GDF que es una proteína de fusión ActRIIB-Fc puede terminar tan pronto como en el aminoácido 109 (la cisteína final); sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan una unión al ligando reducida. El aminoácido 119 está poco conservado y, por tanto, se altera o trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o después conservan la actividad de unión al ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Puede ser deseable usar cualquiera de estas formas, dependiendo del entorno clínico o experimental.
- En el extremo N-terminal de ActRIIB, se espera que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes conservará la actividad de unión al ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 introduce una secuencia de glicosilación ligada a N sin afectar sustancialmente a la unión al ligando. Esto confirma que se toleran bien las mutaciones en la región entre el péptido de escisión señal y la región reticulada de cisteína, correspondiente a los aminoácidos 20-29. En particular, los constructos que comienzan en la posición 20, 21, 22, 23 y 24 conservarán la actividad, y también se espera que los constructos que comienzan en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 conserven la actividad. Los datos mostrados en los ejemplos demuestran que, sorprendentemente, un constructo que comienza en 22, 23, 24 ó 25 tendrá la mayor actividad.
- En conjunto, una porción activa de ActRIIB comprende los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1, y los constructos trampa de GDF pueden comprender, por ejemplo, una porción de ActRIIB que comienza en un residuo correspondiente a los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 ó 39 y que termina en una posición correspondiente a los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 1 ó 39. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición desde 20-29 ó 21-29 y terminan en una posición desde 119-134, 119-133, 129-134, ó 129-133 de SEQ ID NO: 1 ó

39. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición desde 20-24 (ó 21-24, ó 22-25) y terminan en una posición desde 109-134 (ó 109-133), 119-134 (ó 119-133), ó 129-134 (ó 129-133) de SEQ ID NO: 1 ó 39. También se contemplan variantes dentro de estos intervalos, particularmente aquellas que tienen una identidad de al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 99 % con la porción correspondiente de SEQ ID NO: 1 ó 39. El polipéptido trampa de GDF puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % idéntica a los residuos de aminoácido 25-131 de SEQ ID NO: 1 ó 39. El polipéptido trampa de GDF puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % idéntica a las SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 ó 38. El polipéptido trampa de GDF puede consistir en, o consistir esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 ó 38.

La divulgación incluye los resultados de un análisis de estructuras compuestas de ActRIIB, mostradas en la figura 1, demostrando que el bolsillo de unión a ligando está definido por los residuos Y31, N33, N35, L38 hasta T41, E47, E50, Q53 hasta K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 hasta N83, Y85, R87, A92, y E94 hasta F101. En estas posiciones, se espera que se tolerarán mutaciones conservadoras, aunque una mutación K74A se tolera bien, como lo son R40A, K55A, F82A y las mutaciones en la posición L79. R40 es una K en *Xenopus*, que indica que se tolerarán aminoácidos básicos en esta posición. Q53 es una R en ActRIIB bovino y una K en ActRIIB de *Xenopus* y, por tanto, se tolerarán aminoácidos incluyendo R, K, Q, N y H en esta posición. Por tanto, una fórmula general para una proteína trampa de GDF es una que comprende los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1 ó 39, pero que opcionalmente comienza en una posición que oscila entre 20-24 ó 22-25 y termina en una posición que oscila entre 129-134, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 ó 15 cambios conservadores de aminoácidos en el bolsillo de unión a ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en el bolsillo de unión a ligando. Una proteína de este tipo puede conservar más del 80 %, del 90 %, del 95 % o del 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1 ó 39. Los sitios fuera del bolsillo de unión, en los que la variabilidad puede tolerarse particularmente bien, incluyen los extremos amino-terminal y carboxilo-terminal del dominio extracelular (tal como se indicó anteriormente), y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) realmente mejora la unión al ligando en la A64 precedente y, por tanto, se espera que no tenga ningún efecto perjudicial sobre la unión al ligando en la R64 precedente. Este cambio probablemente elimina la glicosilación en N65 en la A64 precedente, demostrando así que es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Aunque se tolera poco un cambio R64A, R64K se tolera bien y, por tanto, puede tolerarse otro residuo básico, tal como H, en la posición 64.

ActRIIB se conserva bien en prácticamente todos los vertebrados, con grandes tramos del dominio extracelular completamente conservados. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB también están altamente conservados. Por consiguiente, las comparaciones de secuencias de ActRIIB de diversos organismos vertebrados proporcionan información sobre los residuos que pueden alterarse. Por tanto, un polipéptido variante de ActRIIB humano activo útil como trampa de GDF puede incluir uno o más aminoácidos en posiciones correspondientes de la secuencia de otro ActRIIB de vertebrado, o puede incluir un residuo que es similar al de la secuencia humana o de otro vertebrado. Los siguientes ejemplos ilustran este enfoque para definir una variante de ActRIIB activa. L46 es una valina en ActRIIB de *Xenopus* y, por tanto, puede alterarse esta posición, y opcionalmente puede alterarse a otro residuo hidrófobo, tal como V, I o F, o un residuo apolar, tal como A. E52 es una K en *Xenopus*, que indica que este sitio puede ser tolerante de una amplia variedad de cambios, incluyendo residuos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es una K en *Xenopus*, que indica que se tolera una amplia variación estructural en esta posición, favoreciéndose los residuos polares, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F108 es una Y en *Xenopus* y, por tanto, deben tolerarse Y u otro grupo hidrófobo, tal como I, V o L. E111 es una K en *Xenopus*, que indica que se tolerarán residuos cargados en esta posición, incluyendo D, R, K y H, así como Q y N. R112 es una K en *Xenopus*, que indica que se toleran residuos básicos en esta posición, incluyendo R y H. A en la posición 119 está relativamente poco conservada, y aparece como P en roedores y V en *Xenopus*, por tanto debe tolerarse esencialmente cualquier aminoácido en esta posición.

La divulgación demuestra que la adición de un sitio de glicosilación ligada a N adicional (N-X-S/T) aumenta la semivida sérica de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, en relación con la forma ActRIIB(R64)-Fc. Al introducir una asparagina en la posición 24 (constructo A24N), se crea una secuencia NXT que puede conferir una semivida más larga. Se encuentran otras secuencias NX(T/S) en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque esta última puede no estar glicosilada eficientemente con la R en la posición 64. Las secuencias N-X-S/T pueden introducirse generalmente en posiciones fuera del bolsillo de unión a ligando definido en la figura 1. Los sitios particularmente adecuados para la introducción de secuencias N-X-S/T no endógenas incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 ó 129-134. Las secuencias N-X-S/T también pueden introducirse en el ligador entre la secuencia de ActRIIB y Fc u otro componente de fusión. Un sitio de este tipo puede introducirse con un esfuerzo mínimo mediante la introducción de una N en la posición correcta con respecto a una S o T preexistente, o mediante la introducción de una S o T en una posición correspondiente a una N preexistente. Por tanto, alteraciones convenientes que crearían un sitio de glicosilación ligada a N son: A24N, R64N, S67N (posiblemente en combinación con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S que se prediga que está glicosilada puede alterarse a una T sin crear ningún sitio inmunogénico, debido a la protección proporcionada por la glicosilación. Asimismo, cualquier T que se prediga que está glicosilada puede alterarse a una S. Por tanto, se contemplan las

alteraciones S67T y S44T. Asimismo, en una variante A24N, puede usarse una alteración S26T. Por consiguiente, una trampa de GDF puede ser una variante de ActRIIB que tenga una o más secuencias de consenso de glicosilación ligada a N no endógenas adicionales.

- 5 La posición L79 de ActRIIB puede alterarse para conferir unas propiedades de unión a activina-miostatina (GDF-11) alteradas. L79P reduce la unión a GDF-11 en mayor medida que la unión a activina. L79E o L79D conserva la unión a GDF-11. Notablemente, las variantes L79E y L79D han reducido en gran medida la unión a activina. Experimentos *in vivo* indican que estos receptores no de activina conservan una capacidad significativa para aumentar los glóbulos rojos, pero muestran efectos disminuidos sobre otros tejidos. Estos datos demuestran la conveniencia y viabilidad de obtener polipéptidos con efectos reducidos sobre la activina. Los métodos descritos en el presente documento pueden utilizar un polipéptido trampa de GDF que es un polipéptido de ActRIIB variante que comprende un aminoácido ácido (por ejemplo, D o E) en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1 ó 39, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, adiciones, o delecciones de aminoácidos adicionales.
- 10 15 Las variaciones descritas pueden combinarse de diversas maneras. Adicionalmente, los resultados del programa de mutagénesis descrito en el presente documento indican que hay posiciones de aminoácido en ActRIIB que a menudo es beneficioso conservar. Estas incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), la posición 78 (hidrófobo, y particularmente triptófano), la posición 37 (ácido, y particularmente ácido aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico), la posición 60 (aminoácido hidrófobo, particularmente fenilalanina o tirosina). Por tanto, en cada una de las variantes dadas a conocer en el presente documento, la divulgación proporciona una trama de aminoácidos que pueden conservarse. Otras posiciones que puede ser conveniente conservar son las siguientes: la posición 52 (aminoácido ácido), la posición 55 (aminoácido básico), la posición 81 (ácido), 98 (polar o cargado, particularmente E, D, R o K).
- 20 25 30 Pueden obtenerse fragmentos aislados de polipéptidos de ActRIIB mediante el cribado de polipéptidos producidos de manera recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica para un polipéptido de ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 y 5). Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica tales como química de f-Moc o t-Boc en fase sólida de Merrifield convencional. Los fragmentos pueden producirse (de manera recombinante o mediante síntesis química) y someterse a prueba para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína de ActRIIB o un ligando de ActRIIB.
- 35 40 El polipéptido trampa de GDF puede ser un polipéptido de ActRIIB variante que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 ó 41. En determinados casos, la trampa de GDF tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 ó 41. En determinadas realizaciones, la trampa de GDF comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 ó 41, en donde la posición correspondiente a L79 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido ácido (por ejemplo, un residuo de aminoácido D o E).
- 45 50 55 También se contempla en el presente documento, aunque no está cubierta por las reivindicaciones, la preparación de variantes funcionales mediante la modificación de la estructura de un polipéptido trampa de GDF para propósitos tales como potenciar la eficacia terapéutica, o la estabilidad (por ejemplo, vida útil en almacenamiento *ex vivo* y resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Los polipéptidos trampa de GDF también pueden producirse mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tendrá ningún efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en cuanto a sus cadenas laterales. Puede determinarse fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido trampa de GDF da como resultado una variante funcional evaluando la capacidad del polipéptido trampa de GDF para producir una respuesta en células en relación con el polipéptido trampa de GDF no modificado o un polipéptido de ActRIIB de tipo natural, o para unirse a uno o más ligandos, tales como activina, GDF-11 o miostatina, en comparación con el polipéptido trampa de GDF no modificado o un polipéptido de ActRIIB de tipo natural.
- 60 65 También se contempla en el presente documento, aunque no está cubierta por las reivindicaciones, la realización de mutaciones en el dominio extracelular (también denominado dominio de unión a ligando) de un polipéptido de ActRIIB de manera que el polipéptido de ActRIIB tenga actividades de unión al ligando alteradas (por ejemplo, afinidad de unión o especificidad de unión). Tales polipéptidos trampa de GDF pueden tener una afinidad de unión alterada (elevada o reducida) por un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos trampa de GDF tienen una especificidad de unión alterada para los ligandos de ActRIIB.

Por ejemplo, la divulgación proporciona polipéptidos trampa de GDF que se unen preferentemente a GDF8/GDF11 en relación con las activinas. La divulgación establece además la conveniencia de tales polipéptidos para reducir los efectos inespecíficos, aunque tales variantes selectivas pueden ser menos convenientes para el tratamiento de enfermedades graves donde pueden necesitarse ganancias muy grandes en los niveles de glóbulos rojos para el efecto terapéutico y donde es aceptable cierto nivel de efecto inespecífico. Por ejemplo, los residuos de aminoácido de la proteína de ActRIIB, tales como E39, K55, Y60, K74, W78, D80, y F101, están en el bolsillo de unión a ligando y median en la unión a sus ligandos tales como activina y GDF8. Por tanto, la presente invención proporciona una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando (por ejemplo, dominio de unión a GDF8) alterado de un receptor ActRIIB, que comprende una o más mutaciones en esos residuos de aminoácido. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad aumentada para un ligando tal como GDF8 en relación con un dominio de unión a ligando de tipo natural de un receptor ActRIIB. A modo de ilustración, estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF8 con respecto a activina. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una razón de K_a para la unión a activina con respecto a K_d para la unión a GDF8 que es al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor en relación con la razón para el dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado tiene una razón de Cl_{50} para inhibir activina con respecto a Cl_{50} para inhibir GDF8 que es al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces mayor en relación con el dominio de unión a ligando de tipo natural. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8 con una Cl_{50} al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces menor que la Cl_{50} para inhibir activina.

Como un ejemplo específico, el residuo de aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión a ligando de ActRIIB puede mutarse a un residuo de aminoácido diferente para producir un polipéptido trampa de GDF que se une preferentemente a GDF8, pero no a activina. Preferiblemente, el residuo D80 se cambia a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: un residuo de aminoácido no cargado, un residuo de aminoácido cargado negativamente, y un residuo de aminoácido hidrófobo. Como un ejemplo específico adicional, el residuo hidrófobo, L79, puede alterarse a los aminoácidos ácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir en gran medida la unión a activina mientras se conserva la unión a GDF11. Tal como reconocerá un experto en la técnica, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas pueden realizarse a nivel de ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación posterior a la traducción o síntesis química. Tales técnicas se conocen bien en la técnica.

Los polipéptidos trampa de GDF pueden tener mutaciones específicas en ActRIIB para alterar la glicosilación del polipéptido de ActRIIB. En la figura 1 se ilustran sitios de glicosilación a modo de ejemplo en polipéptidos trampa de GDF (por ejemplo, los sitios NX(S/T) subrayados). Tales mutaciones pueden seleccionarse para introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación ligada a N o ligada a O. Los sitios de reconocimiento de glicosilación ligada a asparagina comprenden generalmente una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (donde "X" es cualquier aminoácido) que se reconoce específicamente por enzimas de glicosilación celular apropiadas. La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido de ActRIIB de tipo natural (para los sitios de glicosilación ligada a O). Una variedad de sustituciones o delecciones de aminoácidos en una o ambas de las posiciones primera o tercera de aminoácido de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o una delección de aminoácido en la segunda posición) da como resultado la no glicosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio para aumentar el número de restos de hidrato de carbono en un polipéptido trampa de GDF es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido trampa de GDF. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el/los azúcar(es) puede(n) unirse a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina, o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306. La eliminación de uno o más restos de hidrato de carbono presentes en un polipéptido trampa de GDF puede lograrse de manera química y/o enzimática. La desglicosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido trampa de GDF al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o la totalidad de los azúcares, excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja intacta la secuencia de aminoácidos. La desglicosilación química se describe adicionalmente por Hakimuddin *et al.* (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge *et al.* (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono en polipéptidos trampa de GDF puede conseguirse mediante el uso de una variedad de endoglicosidasas y exoglicosidasas tal como se describe por Thotakura *et al.* (1987) Met. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido trampa de GDF puede ajustarse, según sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamíferos, levaduras, insectos y plantas pueden introducir todas ellas patrones de glicosilación diferentes que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, los polipéptidos trampa de GDF para su uso en seres humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporcione una correcta glicosilación, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque también se espera que sean útiles otras líneas celulares de expresión en mamífero.

Esta divulgación contempla además un método para generar variantes, particularmente conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido trampa de GDF, incluyendo, opcionalmente, variantes de truncamiento; las agrupaciones de mutantes combinatorias son especialmente útiles para identificar secuencias de trampa de GDF. El

- propósito de cribar tales bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptido trampa de GDF que tengan propiedades alteradas, tales como una farmacocinética alterada, o una unión al ligando alterada. A continuación se proporcionan una variedad de ensayos de cribado, y tales ensayos pueden usarse para evaluar las variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido trampa de GDF puede cribarse para determinar su capacidad para unirse a un polipéptido de ActRIIB, para prevenir la unión de un ligando de ActRIIB a un polipéptido de ActRIIB o para interferir con la señalización provocada por un ligando de ActRIIB.
- La actividad de un polipéptido trampa de GDF o sus variantes también puede someterse a prueba en un ensayo basado en células o *in vivo*. Por ejemplo, puede evaluarse el efecto de una variante de polipéptido trampa de GDF sobre la expresión de genes implicados en la hematopoyesis. Esto puede realizarse, según sea necesario, en presencia de una o más proteínas ligando de ActRIIB recombinantes (por ejemplo, activina), y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido trampa de GDF y/o variantes del mismo, y opcionalmente, un ligando de ActRIIB. Asimismo, puede administrarse un polipéptido trampa de GDF a un ratón u otro animal, y pueden evaluarse una o más mediciones de sangre, tales como recuento de RBC, niveles de hemoglobina, niveles de hematocrito, reservas de hierro o recuento de reticulocitos, usando métodos reconocidos en la técnica.
- Pueden generarse variantes derivadas de manera combinatoria que tengan una potencia selectiva en relación con un polipéptido trampa de GDF de referencia. Tales proteínas variantes, cuando se expresan a partir de constructos de ADN recombinantes, pueden usarse en protocolos de terapia génica. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tengan semivididas intracelulares drásticamente diferentes de la del polipéptido trampa de GDF no modificado correspondiente. Por ejemplo, puede hacerse que la proteína alterada sea o bien más estable o bien menos estable frente a la degradación proteolítica u otros procesos que dan como resultado la destrucción o de otro modo la inactivación de un polipéptido trampa de GDF no modificado. Tales variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de polipéptido trampa de GDF mediante la modulación de la semivida de los polipéptidos trampa de GDF. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando forma parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estrecho de los niveles de polipéptido trampa de GDF recombinante dentro de la célula. En una proteína de fusión Fc, pueden realizarse mutaciones en el ligador (si lo hay) y/o la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.
- Los polipéptidos trampa de GDF pueden comprender además modificaciones posteriores a la traducción, además de cualquiera que esté presente de manera natural en los polipéptidos de ActRIIB. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, y acilación. Como resultado, los polipéptidos trampa de GDF pueden contener elementos distintos de aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, polisacáridos o monosacáridos, y fosfatos. Los efectos de tales elementos distintos de aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido trampa de GDF pueden someterse a prueba tal como se describe en el presente documento para otras variantes de polipéptido trampa de GDF. Cuando se produce un polipéptido trampa de GDF en células mediante la escisión de una forma naciente del polipéptido trampa de GDF, el procesamiento posterior a la traducción también puede ser importante para el plegamiento y/o la función correctos de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades posteriores a la traducción y pueden elegirse para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos trampa de GDF.
- Los polipéptidos trampa de GDF pueden incluir una proteína de fusión que tiene al menos una porción de un polipéptido de ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Los ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, Fc), proteína de unión a maltosa (MBP), o albúmina sérica humana. Un dominio de fusión puede seleccionarse para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Con el propósito de purificación por afinidad, se usan matrices relevantes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa, y níquel o cobalto. Muchas de tales matrices están disponibles en forma de "kit", tal como el sistema de purificación de GST de Pharmacia y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con parejas de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos trampa de GDF. Los ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP), así como "etiquetas de epítopo", que son habitualmente secuencias peptídicas cortas para las cuales está disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas de epítopo bien conocidas para las cuales están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos incluyen las etiquetas FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la gripe, y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como para el factor Xa o trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y libere de ese modo las proteínas recombinantes a partir de las mismas. Las proteínas liberadas pueden aislarse entonces a partir del dominio de fusión mediante una separación cromatográfica posterior. Un polipéptido trampa de GDF puede fusionarse con un dominio que estabilice el polipéptido trampa de GDF *in vivo* (un dominio "estabilizador"). Por "estabilización" se entiende cualquier cosa que aumente la semivida sérica, independientemente de si esto se debe a una destrucción disminuida, un aclaramiento disminuido por parte del riñón, u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas convenientes a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones con albúmina sérica humana pueden conferir propiedades convenientes. Otros tipos de dominios de

fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios de multimerización (por ejemplo, dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como aumentar adicionalmente los niveles de glóbulos rojos).

- 5 Como un ejemplo específico, la presente invención proporciona una trampa de GDF que es una proteína de fusión ActRIIB-Fc que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, de unión a ligando) de polipéptido de ActRIIB fusionado con un dominio Fc. A continuación se muestra la secuencia de un dominio Fc a modo de ejemplo (SEQ ID NO: 6).

```

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPIEKTIASKAK
GQPREPQVTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
PFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

```

10

Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, Lys-322, y Asn-434. En determinados casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida para unirse al receptor de Fc_y en relación con un dominio Fc de tipo natural. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, mutación Asn-434) tiene una capacidad aumentada para unirse al receptor de Fc relacionado con CMH de clase I (FcRN) en relación con un dominio Fc de tipo natural.

15

20 Se entiende que pueden disponerse diferentes elementos de las proteínas de fusión de cualquier manera que sea compatible con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido trampa de GDF puede colocarse de manera C-terminal con respecto a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo puede colocarse de manera C-terminal con respecto a un polipéptido trampa de GDF. El dominio de polipéptido trampa de GDF y el dominio heterólogo no tienen por qué ser adyacentes en una proteína de fusión, y pueden incluirse dominios o secuencias de aminoácidos adicionales de manera C-terminal o N-terminal con respecto a cualquier dominio o entre los dominios.

25 Una proteína de fusión trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la fórmula A-B-C. La porción B es un polipéptido de ActRIIB con truncamiento en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal que consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 26-132 de SEQ ID NO: 26. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácido, y ambas porciones A y C, cuando están presentes, son heterólogas con respecto a B. Las porciones A y/o C pueden unirse a la porción B mediante una secuencia de ligador. Los ligadores a modo de ejemplo incluyen ligadores polipeptídicos cortos tales como 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 residuos de glicina, tales como, por ejemplo, un ligador Gly-Gly-Gly. Otros ligadores adecuados se describen anteriormente en el presente documento. Una proteína de fusión trampa de GDF puede 30 comprender una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la fórmula A-B-C, en donde A es una secuencia líder, B consiste en los aminoácidos 26-132 de SEQ ID NO: 26, y C es una porción polipeptídica que potencia una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos proteicos, y/o purificación. Una proteína de fusión trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la fórmula A-B-C, en donde A es una secuencia líder de TPA, B consiste en los 35 aminoácidos 26-132 de SEQ ID NO: 26, y C es un dominio Fc de inmunoglobulina. Una proteína de fusión trampa de GDF preferida comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 26.

40 Los polipéptidos trampa de GDF pueden contener una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos trampa de GDF. Por ejemplo, tales modificaciones potencian la semivida *in vitro* de los polipéptidos trampa de GDF, potencian la semivida circulatoria de los polipéptidos trampa de GDF o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos trampa de GDF. Tales modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, 45 proteínas de fusión (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido trampa de GDF y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (incluyendo, por ejemplo, la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido trampa de GDF), y modificaciones de resto de hidrato de carbono (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de restos de hidrato de carbono a partir de un polipéptido trampa de GDF). En el caso de 50 proteínas de fusión, un polipéptido trampa de GDF se fusiona con un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Tal como se usa en el presente documento, el término "dominio estabilizador" no sólo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de proteínas de fusión, sino que también 55 incluye modificaciones no proteicas tales como un resto de hidrato de carbono, o un polímero no proteico, tal como polietilenglicol.

55 También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertas por las reivindicaciones, formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos trampa de GDF, que se aíslan a partir de, o por lo demás están sustancialmente libres de, otras proteínas.

60 Los polipéptidos trampa de GDF (modificados o no modificados) pueden producirse mediante una variedad de

técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, tales polipéptidos trampa de GDF pueden sintetizarse usando técnicas de química de proteínas convencionales tales como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) y Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1992). Además, están disponibles comercialmente sintetizadores de péptidos automatizados (por ejemplo, modelo 396 de Advanced ChemTech; Milligen/Bioscience 9600). Alternativamente, los polipéptidos trampa de GDF, los fragmentos o las variantes de los mismos pueden producirse de manera recombinante usando diversos sistemas de expresión (por ejemplo, *E. coli*, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, baculovirus) tal como se conoce bien en la técnica. Los polipéptidos trampa de GDF modificados o no modificados pueden producirse mediante digestión de polipéptidos trampa de GDF de longitud completa producidos de manera recombinante usando, por ejemplo, una proteasa, por ejemplo, tripsina, termolisin, quimotripsina, pepsina, o enzima convertidora de aminoácidos básicos emparejados (PACE). Puede usarse análisis informático (usando un software disponible comercialmente, por ejemplo, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) para identificar sitios de escisión proteolítica. Alternativamente, tales polipéptidos trampa de GDF pueden producirse a partir de polipéptidos trampa de GDF de longitud completa producidos de manera recombinante tales como técnicas convencionales conocidas en la técnica, tal como mediante escisión química (por ejemplo, bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

3. Ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos trampa de GDF

20 También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertos por las reivindicaciones, ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican para cualquiera de los polipéptidos trampa de GDF dados a conocer en el presente documento. SEQ ID NO: 4 codifica para un polipéptido precursor de ActRIIB que se produce de manera natural, mientras que SEQ ID NO: 5 codifica para un polipéptido de ActRIIB soluble, y las SEQ ID NO: 25, 27, 30 y 31 codifican para trampas de GDF solubles. Los ácidos nucleicos objeto pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en métodos para preparar polipéptidos trampa de GDF o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia génica).

30 Puede entenderse además que los ácidos nucleicos objeto que codifican para polipéptidos trampa de GDF incluyen ácidos nucleicos que son variantes de las SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 y 31. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o delecciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas; y, por tanto, incluirán secuencias codificantes que difieren de la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificante designada en las SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 y 31.

35 También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertas por las reivindicaciones, secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que son al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % idénticas a SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ó 31. Un experto habitual en la técnica apreciará que también se describen en el presente documento secuencias de ácido nucleico complementarias a SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ó 31, y variantes de SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ó 31. Las secuencias de ácido nucleico pueden ser aisladas, recombinantes, y/o estar fusionadas con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

40 Los ácidos nucleicos también pueden incluir secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones altamente rigurosas con la secuencia de nucleótidos designada en SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ó 31, una secuencia complementaria de SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ó 31, o fragmentos de las mismas. Tal como se comentó anteriormente, un experto habitual en la técnica entenderá fácilmente que pueden variarse las condiciones de rigurosidad apropiada que fomentan la hibridación del ADN. Por ejemplo, puede realizarse la hibridación a 6,0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado puede seleccionarse de una baja rigurosidad de aproximadamente 2,0 x SSC a 50 °C a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente de aproximadamente 22 °C hasta condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Pueden variarse tanto la temperatura como la sal, o puede mantenerse constante la temperatura o la concentración de sal mientras que se cambia la otra variable. También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertos por las reivindicaciones, ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 x SSC a temperatura ambiente, seguido de un lavado a 2 x SSC a temperatura ambiente.

45 En el presente documento se describen ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos tal como se exponen en SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ó 31 debido a la redundancia del código genético. Por ejemplo, varios aminoácidos se designan por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para la histidina) pueden dar como resultado mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. El polipéptido trampa de GDF puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos alternativa. Las secuencias de nucleótidos alternativas son redundantes con respecto a la secuencia de ácido nucleico trampa de GDF nativa, pero todavía codifican para la misma proteína de fusión. La trampa de GDF que tiene SEQ ID NO: 26 puede estar codificada por una secuencia de ácido nucleico alternativa que comprende SEQ ID NO: 30. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objeto entre células de mamífero. Un

experto en la técnica apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5 % de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican para una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. En el presente documento se describen todas y cada una de tales variaciones de nucleótidos y los polimorfismos de aminoácidos resultantes.

5 Los ácidos nucleicos recombinantes pueden estar unidos operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en un constructo de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán generalmente apropiadas para la célula huésped usada para la expresión. En la técnica se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped. Normalmente, 10 dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. La invención contempla promotores constitutivos o inducibles tal como se conocen en la técnica. Los promotores 15 pueden ser o bien promotores que se producen de manera natural, o bien promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Un constructo de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o el constructo de expresión puede insertarse en un cromosoma. El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables se conocen bien en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

20 El ácido nucleico objeto puede proporcionarse en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido trampa de GDF y unido operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras están reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido trampa de GDF. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, 25 potenciadores, y otros elementos de control de la expresión. Se describen secuencias reguladoras a modo de ejemplo en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, en estos vectores puede usarse cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se unen operativamente a la misma para expresar secuencias de ADN que codifican para un polipéptido trampa de GDF. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor 30 temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores de RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por ARN polimerasa T7, las principales regiones operadoras y promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de cubierta fd, el promotor para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores 35 de los factores de apareamiento α de levadura, el promotor de poliedro del sistema de baculovirus y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse y/o del tipo de proteína que se desea expresar. Además, también deben considerarse el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese 40 número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores antibióticos.

Un ácido nucleico recombinante de la invención puede producirse mediante ligación del gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para su expresión en células procariotas, células eucariotas (de levadura, ave, insecto o mamífero), o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido trampa de GDF 45 recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para su expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

50 Algunos vectores de expresión de mamífero contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTK2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamífero adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de farmacorresistencia en células tanto procariotas como 55 eucariotas. Alternativamente, pueden usarse derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (VPB-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. A continuación pueden encontrarse ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluyendo retrovirales) en la descripción de sistemas de administración de terapia génica. En la técnica se conocen bien los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped. 60 Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2^a ed., ed. por Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, 65 pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1), y vectores derivados de pBlueBac (tales como pBlueBac III que contiene β -gal).

- 5 Un vector puede diseñarse para la producción de los polipéptidos trampa de GDF objeto en células CHO, tal como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Tal como resultará evidente, los constructos génicos objeto pueden usarse para provocar la expresión de los polipéptidos trampa de GDF objeto en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para su purificación.
- 10 Esta invención también se refiere a una célula huésped transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (por ejemplo, SEQ ID NO: 4, 5, 25, 27, 30 ó 31) para uno o más de los polipéptidos trampa de GDF objeto. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido trampa de GDF de la invención puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura, o células de mamífero. Los expertos en la técnica conocen otras células huésped adecuadas.
- 15 20 25 30 35 Por consiguiente, la presente invención se refiere además a métodos para producir los polipéptidos trampa de GDF objeto. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica para un polipéptido trampa de GDF puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido trampa de GDF. El polipéptido trampa de GDF puede secretarse y aislarse a partir de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido trampa de GDF. Alternativamente, el polipéptido trampa de GDF puede conservarse de manera citoplásica o en una fracción de membrana, y las células pueden recogerse, someterse a lisis, y la proteína puede aislarse. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. En la técnica se conocen bien medios adecuados para el cultivo celular. Los polipéptidos trampa de GDF objeto pueden aislarse a partir de medio de cultivo celular, células huésped, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, y purificación por inmunoadsorción con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos trampa de GDF. El polipéptido trampa de GDF puede ser una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.
- 30 35 Un gen de fusión que codifica para una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)/enterocinasa en el extremo N-terminal de la porción deseada del polipéptido trampa de GDF recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad usando una resina de metal de Ni^{2+} . Entonces, la secuencia líder de purificación puede eliminarse posteriormente mediante tratamiento con enterocinasa para proporcionar el polipéptido trampa de GDF purificado (por ejemplo, véanse Hochuli *et al.*, (1987) *J. Chromatography* 411:177; y Janknecht *et al.*, *PNAS USA* 88:8972).
- 40 45 Se conocen bien técnicas para preparar genes de fusión. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican para secuencias de polipéptido diferentes se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos terminales romos o escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos terminales apropiados, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable, y ligación enzimática. El gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, puede llevarse a cabo amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse para generar una secuencia génica químérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons: 1992).
4. Ensayos de cribado
- 50 55 60 También se describe en el presente documento, aunque no está cubierto por las reivindicaciones, el uso de los polipéptidos trampa de GDF objeto (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB variantes solubles) para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de los polipéptidos de ActRIIB. Los compuestos identificados a través de este cribado pueden someterse a prueba para evaluar su capacidad para modular los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o reticulocitos *in vivo* o *in vitro*. Estos compuestos pueden someterse a prueba, por ejemplo, en modelos animales.
- 65 Existen numerosos enfoques para realizar el cribado en busca de agentes terapéuticos para aumentar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina seleccionando como diana la señalización de ActRIIB. Puede llevarse a cabo cribado de alto rendimiento de los compuestos para identificar agentes que perturban los efectos mediados por ActRIIB sobre una línea celular seleccionada. El ensayo puede llevarse a cabo para cribar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido de ActRIIB a su pareja de unión, tal como un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Alternativamente, el ensayo puede usarse para identificar compuestos que potencian la unión de un polipéptido de ActRIIB a su pareja de unión, tal como un ligando de ActRIIB. Los compuestos pueden identificarse por su capacidad para interaccionar con un polipéptido de ActRIIB.
- 65 Una variedad de formatos de ensayo serán suficientes y, a la luz de la presente divulgación, no obstante, un experto habitual en la técnica comprenderá aquellos no descritos expresamente en el presente documento. Tal como se

describe en el presente documento, los compuestos (agentes) de prueba de la invención pueden crearse mediante cualquier método químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos objeto pueden ser biomoléculas que se producen de manera natural sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) que van a someterse a prueba para determinar su capacidad para actuar como moduladores del crecimiento tisular pueden producirse, por ejemplo, por bacterias, levadura, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producirse de manera química (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluyendo peptidomiméticos), o producirse de manera recombinante. Los compuestos de prueba contemplados por la presente invención incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas, y moléculas de ácido nucleico. El agente de prueba puede ser una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2.000 Dalton.

Los compuestos de prueba de la invención pueden proporcionarse como entidades discretas individuales, o proporcionarse en bibliotecas de mayor complejidad, tales como preparadas mediante química combinatoria. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de prueba al sistema de prueba puede ser o bien en forma aislada o bien como mezclas de compuestos, especialmente en etapas de cribado iniciales. Opcionalmente, los compuestos pueden derivatizarse opcionalmente con otros compuestos y tener grupos derivatizantes que facilitan el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitativos de grupos derivatizantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), agente de reticulación fotoactivables, o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de cribado de fármacos que someten a prueba bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son convenientes ensayos de alto rendimiento con el fin de maximizar el número de compuestos analizados en un periodo de tiempo dado. A menudo se prefieren los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, tales como los que pueden derivarse con proteínas purificadas o semipurificadas, como cribados "primarios" en el sentido de que pueden generarse para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de prueba. Además, los efectos de la toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de prueba pueden ignorarse generalmente en el sistema *in vitro*, centrándose en su lugar el ensayo principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular que puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido de ActRIIB y su pareja de unión (por ejemplo, un ligando de ActRIIB).

Simplemente a modo de ilustración, en un ensayo de cribado a modo de ejemplo de la presente invención, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido de ActRIIB aislado y purificado que normalmente es capaz de unirse a un ligando de ActRIIB, según sea apropiado para la intención del ensayo. A la mezcla del compuesto y el polipéptido de ActRIIB se le añade entonces una composición que contiene un ligando de ActRIIB. La detección y cuantificación de complejos de ActRIIB/ligando de ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación del complejo entre el polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de respuesta a la dosis a partir de los datos obtenidos usando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, también puede realizarse un ensayo de control para proporcionar un nivel inicial para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade ligando de ActRIIB aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido de ActRIIB, y se cuantifica la formación del complejo de ActRIIB/ligando de ActRIIB en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, puede variarse el orden en el que pueden mezclarse los reactantes, y pueden mezclarse simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, pueden usarse extractos celulares y lisados para producir un sistema de ensayo libre de células adecuado.

La formación del complejo entre el polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión puede detectarse mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse usando, por ejemplo, proteínas marcadas de manera detectable, tales como un polipéptido de ActRIIB o su proteína de unión radiomarcado (por ejemplo, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C o ³H), marcado de manera fluorescente (por ejemplo, FITC), o marcado de manera enzimática, mediante inmunoensayo, o mediante detección cromatográfica.

También se contempla en el presente documento, aunque no está cubierto por las reivindicaciones, el uso de ensayos de polarización por fluorescencia y ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como aquellos basados en guías de onda ópticas (publicación PCT WO 96/26432 y patente estadounidense n.º 5.677.196), resonancia de plasmón superficial (SPR), sensores de carga superficial, y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchos de tales usos contemplados, aunque no reivindicados.

Además, también se contempla en el presente documento, aunque no está cubierto por las reivindicaciones, el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que alteran o potencian la interacción entre un polipéptido de ActRIIB y su pareja de unión. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.283.317; Zervos *et al.* (1993) Cell 72:223-232; Madura *et al.* (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) Biotechniques 14:920-924; e Iwabuchi *et al.* (1993) Oncogene 8:1693-1696).

5 También se contempla en el presente documento, aunque no está cubierto por las reivindicaciones, el uso de sistemas de dos híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión. Véanse, por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal y Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; y las patentes estadounidenses n.^{os} 5.525.490; 5.955.280; y 5.965.368.

10 Los compuestos objeto pueden identificarse por su capacidad para interaccionar con un polipéptido de ActRIIB. La interacción entre el compuesto y el polipéptido de ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, tal interacción puede identificarse a nivel de proteína usando métodos bioquímicos *in vitro*, incluyendo fotorreticulación, 15 unión a ligandos radiomarcados, y cromatografía de afinidad (Jakoby WB *et al.*, 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En determinados casos, los compuestos pueden cribarse en un ensayo basado en mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido de ActRIIB. Esto puede incluir un acontecimiento de unión en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen que codifica para un polipéptido de ActRIIB puede transfectarse con un sistema indicador (por ejemplo, β-galactosidasa, luciferasa, o proteína fluorescente verde) en una célula y cribarse frente a la biblioteca preferiblemente mediante un cribado de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Pueden usarse otros ensayos de unión basados en mecanismo, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión pueden realizarse con la diana fijada a un pocillo, una perla o un chip o capturarse mediante un anticuerpo inmovilizado o resolverse mediante electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse normalmente usando resonancia colorimétrica o de fluorescencia 20 o de plasmón superficial.

5. Usos terapéuticos a modo de ejemplo

25 Los polipéptidos trampa de GDF pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos tales como roedores y primates, y particularmente en pacientes humanos. Los polipéptidos trampa de GDF, opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO, pueden ser útiles para tratar la eritropoyesis ineficaz. Originalmente distinguida de la anemia aplásica, la hemorragia, o la hemólisis periférica basándose en estudios ferrocinéticos (Ricketts *et al.*, 1978, Clin Nucl Med 3:159-164), la eritropoyesis ineficaz describe un diverso grupo de anemias en las que la producción de RBC maduros es menor de lo que se esperaría dado el número de 30 precursores eritroides (eritroblastos) presentes en la médula ósea (Tanno *et al.*, 2010, Adv Hematol 2010:358283). En tales anemias, la hipoxia tisular persiste a pesar de los niveles elevados de eritropoyetina debido a la producción ineficaz de RBC maduros. Eventualmente se desarrolla un ciclo vicioso en el que los niveles elevados de eritropoyetina impulsan una expansión masiva de eritroblastos, que posiblemente conduce a esplenomegalia (agrandamiento del bazo) debido a eritropoyesis extramedular (Aizawa *et al.*, 2003, Am J Hematol 74:68-72), 35 patología ósea inducida por eritroblastos (Di Matteo *et al.*, 2008, J Biol Regul Homeost Agents 22:211-216), y hemocromatosis tisular, incluso en ausencia de transfusiones terapéuticas de RBC (Pippard *et al.*, 1979, Lancet 2:819-821). Por tanto, al reforzar la eficacia eritropoyética, un polipéptido trampa de GDF puede romper el ciclo mencionado anteriormente y puede aliviar no sólo la anemia subyacente, sino también las complicaciones asociadas 40 de niveles elevados de eritropoyetina, esplenomegalia, patología ósea, y hemocromatosis tisular. Los polipéptidos trampa de GDF pueden tratar la eritropoyesis ineficaz, incluyendo anemia y niveles elevados de EPO, así como complicaciones tales como esplenomegalia, patología ósea inducida por eritroblastos, y hemocromatosis, y sus 45 patologías acompañantes. Con esplenomegalia, tales patologías incluyen dolor torácico o abdominal e hiperplasia reticuloendotelial. La hematopoyesis extramedular puede producirse no sólo en el bazo, sino también posiblemente en otros tejidos en forma de pseudotumores hematopoyéticos extramedulares (Musallam *et al.*, 2012, Cold Spring Harb Perspect Med 2:a013482). Con patología ósea inducida por eritroblastos, las patologías acompañantes incluyen densidad mineral ósea baja, osteoporosis, y dolor óseo (Haidar *et al.*, 2011, Bone 48:425-432). Con hemocromatosis, las patologías acompañantes incluyen supresión de hepcidina e hiperabsorción de hierro alimentario (Musallam *et al.*, 2012, Blood Rev 26 (supl. 1):S16-S19), endocrinopatías múltiples y fibrosis/cirrosis hepática (Galanello *et al.*, 2010, Orphanet J Rare Dis 5:11), y miocardiopatía por hemocromatosis (Lekawwanijit *et al.*, 2009, Can J Cardiol 25:213-218).

55 Las causas más comunes de la eritropoyesis ineficaz son los síndromes de talasemia, hemoglobinopatías hereditarias en las que desequilibrios en la producción de cadenas intactas de alfa-hemoglobina y beta-hemoglobina conducen a una apoptosis aumentada durante la maduración de eritroblastos (Schrier, 2002, Curr Opin Hematol 9:123-126). En conjunto las talasemias se encuentran entre los trastornos genéticos más frecuentes en todo el mundo, con patrones epidemiológicos cambiantes que se predice que contribuyen a un creciente problema de sanidad pública tanto en EE. UU. como a nivel mundial (Vichinsky, 2005, Ann NY Acad Sci 1054:18-24). Los síndromes de talasemia se nombran según su gravedad. Por tanto, las α-talasemias incluyen α-talasemia menor (también conocida como rasgo de α-talasemia; dos genes de α-globina afectados), enfermedad de hemoglobina H (tres genes de α-globina afectados), y α-talasemia mayor (también conocida como hidropsia fetal; cuatro genes de α-globina afectados). Las β-talasemias incluyen β-talasemia menor (también conocida como rasgo de β-talasemia; un gen de β-globina afectado), β-talasemia intermedia (dos genes de β-globina afectados), talasemia de hemoglobina E (dos genes de β-globina afectados), y β-talasemia mayor (también conocida como anemia de Cooley; dos genes de β-globina afectados que dan como resultado una ausencia completa de la proteína β-globina). La β-talasemia tiene un impacto sobre múltiples órganos, está asociada con una morbimortalidad considerable, 60 y

actualmente requiere atención de por vida. Aunque la esperanza de vida en pacientes con β-talasemia ha aumentado en los últimos años debido al uso de transfusiones de sangre regulares en combinación con quelación de hierro, la hemocromatosis resultante tanto de las transfusiones como de la absorción gastrointestinal excesiva de hierro puede provocar graves complicaciones tales como enfermedad cardiaca, trombosis, hipogonadismo, hipotiroidismo, diabetes, osteoporosis, y osteopenia (Rund *et al.*, 2005, N Engl J Med 353:1135-1146). Tal como se demuestra en el presente documento con un modelo de ratón de β-talasemia, puede usarse un polipéptido trampa de GDF, opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO, para tratar los síndromes de talasemia.

- 5 10 Los polipéptidos trampa de GDF, opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO, pueden usarse para tratar trastornos de eritropoyesis ineficaz además de síndromes de talasemia. Tales trastornos incluyen anemia sideroblástica (hereditaria o adquirida); anemia diseritropoyética (tipos I y II); anemia drepanocítica; esferocitosis hereditaria; deficiencia de piruvato cinasa; anemias megaloblásticas, posiblemente provocadas por afecciones tales como deficiencia de folato (debido a enfermedades congénitas, ingesta disminuida, o necesidades aumentadas), deficiencia de cobalamina (debido a enfermedades congénitas, anemia perniciosa, absorción alterada, insuficiencia pancreática, o ingesta disminuida), determinados fármacos, o causas inexplicadas (anemia diseritropoyética congénita, anemia megaloblástica resistente, o eritroleucemia); anemias mieloptísis, incluyendo mielofibrosis (metaplasia mieloide) y mieloptisis; porfiria eritropoyética congénita; y saturnismo.
- 15 20 25 Tal como se usa en el presente documento, un producto terapéutico que "previene" un trastorno o una afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o la afección en la muestra tratada en relación con una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o la afección en relación con la muestra de control no tratada. El término "que trata", tal como se usa en el presente documento, incluye la mejora o eliminación de la afección una vez que se ha establecido. En cualquier caso, la prevención o el tratamiento puede discernirse en el diagnóstico proporcionado por un médico u otro sanitario y el resultado esperado de la administración del agente terapéutico.

Tal como se muestra en el presente documento, los polipéptidos trampa de GDF, opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO, pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o reticulocitos en individuos sanos, y tales polipéptidos trampa de GDF pueden usarse en poblaciones de pacientes seleccionadas. Los ejemplos de poblaciones de pacientes apropiadas incluyen aquellas con niveles de glóbulos rojos o hemoglobina indeseablemente bajos, tales como pacientes que tienen una anemia, y aquellos que están en riesgo de desarrollar niveles de glóbulos rojos o hemoglobina indeseablemente bajos, tales como aquellos pacientes que están a punto de someterse a cirugía mayor u otros procedimientos que pueden dar como resultado una pérdida de sangre sustancial. Un paciente con niveles adecuados de glóbulos rojos puede tratarse con un polipéptido trampa de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos, y luego se extrae sangre y se almacena para su posterior uso en transfusiones.

40 Los polipéptidos trampa de GDF, opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO, dados a conocer en el presente documento pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos en pacientes que tienen una anemia. Cuando se observan los niveles de hemoglobina en seres humanos, un nivel menor de lo normal para la categoría de sexo y edad apropiada puede ser indicativo de anemia, aunque se tienen en cuenta las variaciones individuales. Por ejemplo, un nivel de hemoglobina de 12 g/dl se considera generalmente el límite inferior de lo normal en la población adulta general. Las posibles causas incluyen pérdida de sangre, deficiencias nutricionales, reacción a la medicación, diversos problemas con la médula ósea y muchas enfermedades. Más particularmente, la anemia se ha asociado con una variedad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide, trasplante de médula ósea. La anemia también puede estar asociada con las siguientes afecciones: tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon); tumores del sistema linfático (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin); tumores del sistema hematopoyético (por ejemplo, leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple); radioterapia; quimioterapia (por ejemplo, regímenes que contienen platino); enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, incluyendo, pero sin limitarse a, artritis reumatoide, otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades cutáneas agudas o crónicas (por ejemplo, psoriasis), enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); enfermedad o insuficiencia renal aguda o crónica, incluyendo afecciones idiopáticas o congénitas; enfermedad hepática aguda o crónica; sangrado agudo o crónico; situaciones en las que no es posible la transfusión de glóbulos rojos debido a aloanticuerpos o autoanticuerpos del paciente y/o por motivos religiosos (por ejemplo, algunos testigos de Jehová); infecciones (por ejemplo, malaria, osteomielitis); hemoglobinopatías, incluyendo, por ejemplo, enfermedad drepanocítica, talasemias; consumo de drogas o drogadicción, por ejemplo, alcoholismo; pacientes pediátricos con anemia de cualquier causa para evitar la transfusión; y pacientes ancianos o pacientes con enfermedad cardiopulmonar subyacente con anemia que no pueden recibir transfusiones debido a preocupaciones acerca de la sobrecarga circulatoria.

65 El síndrome mielodisplásico (SMD) es una colección diversa de afecciones hematológicas caracterizadas por una producción ineficaz de glóbulos sanguíneos mieloides y riesgo de transformación en leucemia mielógena aguda. En pacientes con SMD, las células madre sanguíneas no maduran para dar glóbulos rojos, glóbulos blancos, o plaquetas sanos. Los trastornos de SMD incluyen, por ejemplo, anemia resistente, anemia resistente con

sideroblastos en anillo, anemia resistente con exceso de blastos, anemia resistente con exceso de blastos en transformación, citopenia resistente con displasia multilinaje, y síndrome mielodisplásico asociado con una anomalía aislada en el cromosoma 5q. Como estos trastornos se manifiestan como defectos irreversibles tanto en cantidad como en calidad de células hematopoyéticas, la mayoría de los pacientes con SMD están afectados por anemia crónica. Por tanto, los pacientes con SMD eventualmente requieren transfusiones de sangre y/o tratamiento con factores de crecimiento (por ejemplo, eritropoyetina o G-CSF) para aumentar los niveles de glóbulos rojos. Sin embargo, muchos pacientes con SMD desarrollan efectos secundarios debido a la frecuencia de tales terapias. Por ejemplo, los pacientes que reciben transfusión frecuente de glóbulos rojos pueden tener daño tisular y orgánico por la acumulación de hierro adicional. Tal como se demuestra en los ejemplos a continuación, los polipéptidos trampa de GDF se usaron para tratar la anemia en un modelo de ratón de SMD. Por consiguiente, los polipéptidos trampa de GDF dados a conocer en el presente documento pueden usarse para tratar a pacientes que tienen SMD. Los pacientes que padecen SMD pueden tratarse usando una combinación de un polipéptido trampa de GDF en combinación con un activador del receptor de EPO. El paciente que padece SMD puede tratarse usando una combinación de un polipéptido trampa de GDF y uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar el SMD, incluyendo, por ejemplo, talidomida, lenalidomida, azacitadina, decitabina, eritropoyetas, deferoxamina, globulina antitimocítica, filgrastim (G-CSF) y un agonista de la ruta de señalización de eritropoyetina.

Los polipéptidos trampa de GDF, opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO, serían apropiados para tratar anemias de médula ósea hipoproliferativa, que normalmente están asociadas con poco cambio en la morfología de glóbulos rojos (RBC). Las anemias hipoproliferativas incluyen: 1) anemia de enfermedad crónica, 2) anemia de enfermedad renal, y 3) anemia asociada con estados hipometabólicos. En cada uno de estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena son inapropiadamente bajos para el grado de anemia observado. Otras anemias hipoproliferativas incluyen: 4) anemia por deficiencia de hierro en estadio temprano, y 5) anemia provocada por daño a la médula ósea. En estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena son apropiadamente elevados para el grado de anemia observado.

El tipo más común es la anemia de enfermedad crónica, que abarca inflamación, infección, lesión tisular, y afecciones tales como cáncer, y se distingue tanto por bajos niveles de eritropoyetina como por una respuesta inadecuada a la eritropoyetina en la médula ósea (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17^a ed.; McGraw Hill, Nueva York, págs. 628-634). Muchos factores pueden contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. Algunos están asociados con el propio proceso patológico y la generación de citocinas inflamatorias tales como interleucina-1, interferón-gamma, y factor de necrosis tumoral (Bron *et al.*, 2001, Semin Oncol 28 (supl. 8):1-6). Entre estos efectos, la inflamación induce el péptido regulador de hierro clave, la hepcidina, inhibiendo de ese modo la exportación de hierro a partir de macrófagos y limitando generalmente la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis (Ganz, 2007, J Am Soc Nephrol 18:394-400). La pérdida de sangre a través de diversas rutas también puede contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. La prevalencia de la anemia debida a la progresión del cáncer varía según el tipo de cáncer, oscilando desde el 5 % en cáncer de próstata hasta el 90 % en mieloma múltiple. La anemia relacionada con el cáncer tiene profundas consecuencias para los pacientes, incluyendo fatiga y calidad de vida reducida, eficacia del tratamiento reducida, y mortalidad aumentada.

La enfermedad renal crónica está asociada con la anemia hipoproliferativa que varía en cuanto a gravedad según el grado de insuficiencia renal. Tal anemia se debe principalmente a la producción inadecuada de eritropoyetina y a una supervivencia reducida de glóbulos rojos. La enfermedad renal crónica habitualmente avanza de manera gradual a lo largo de un periodo de años o décadas hasta la enfermedad en estadio terminal (estadio 5), momento en el cual se requiere diálisis o trasplante de riñón para la supervivencia del paciente. A menudo, la anemia se desarrolla temprano en este proceso y empeora a medida que avanza la enfermedad. Las consecuencias clínicas de la anemia de enfermedad renal están bien documentadas e incluyen desarrollo de hipertrofia del ventrículo izquierdo, función cognitiva alterada, calidad de vida reducida, y función inmunitaria alterada (Levin *et al.*, 1999, Am J Kidney Dis 27:347-354; Nissensohn, 1992, Am J Kidney Dis 20 (supl. 1):21-24; Revicki *et al.*, 1995, Am J Kidney Dis 25:548-554; Gafter *et al.*, 1994, Kidney Int 45:224-231). Tal como demostraron los solicitantes en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica (véase el ejemplo a continuación), puede usarse un polipéptido trampa de GDF, opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO, para tratar la anemia de enfermedad renal.

Muchas afecciones que dan como resultado una tasa hipometabólica pueden producir una anemia hipoproliferativa de leve a moderada. Entre tales afecciones están los estados de deficiencia endocrina. Por ejemplo, la anemia puede producirse en enfermedad de Addison, hipotiroidismo, hiperparatiroidismo, o machos que están castrados o tratados con estrógeno. La anemia de leve a moderada también puede producirse con una ingesta alimentaria reducida de proteína, una afección particularmente prevalente en los ancianos. Finalmente, puede desarrollarse anemia en pacientes con enfermedad hepática crónica que surge de prácticamente cualquier causa (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17^a ed.; McGraw Hill, Nueva York, págs. 628-634).

La anemia resultante de pérdida de sangre aguda de volumen suficiente, tal como de traumatismo o hemorragia posparto, se conoce como anemia poshemorrágica aguda. La pérdida de sangre aguda provoca inicialmente hipovolemia sin anemia puesto que hay un agotamiento proporcional de RBC junto con otros constituyentes de la sangre. Sin embargo, la hipovolemia rápidamente desencadenará mecanismos fisiológicos que desplazan líquido desde el compartimento extravascular hasta el compartimento vascular, lo que da como resultado hemodilución y

anemia. Si es crónica, la pérdida de sangre agota gradualmente las reservas corporales de hierro y eventualmente conduce a deficiencia de hierro. Tal como demostraron los solicitantes en un modelo de ratón (véase el ejemplo a continuación), puede usarse un polipéptido trampa de GDF, opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO, para acelerar la recuperación de la anemia de pérdida de sangre aguda.

5 La anemia por deficiencia de hierro es el estadio final en una progresión gradual de deficiencia de hierro creciente que incluye equilibrio negativo de hierro y eritropoyesis con deficiencia de hierro como estadios intermedios. La deficiencia de hierro puede ser el resultado de demanda de hierro aumentada, ingesta de hierro disminuida, o pérdida de hierro aumentada, tal como se exemplifica en condiciones tales como embarazo, dieta inadecuada, 10 hipoabsorción intestinal, inflamación aguda o crónica, y pérdida de sangre aguda o crónica. Con anemia de leve a moderada de este tipo, la médula ósea permanece hipoproliferativa, y la morfología de RBC es mayormente normal; sin embargo, incluso la anemia leve puede dar como resultado algunos RBC hipocrómicos microcíticos, y la transición a anemia con deficiencia de hierro grave está acompañada de hiperproliferación de la médula ósea y RBC microcíticos e hipocrómicos cada vez más prevalentes (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 15 17^a ed.; McGraw Hill, Nueva York, págs. 628-634). La terapia apropiada para la anemia por deficiencia de hierro depende de su causa y gravedad, con preparaciones orales de hierro, formulaciones parenterales de hierro, y transfusión de RBC como principales opciones convencionales. Puede usarse un polipéptido trampa de GDF, 20 opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO, para tratar anemias por deficiencia de hierro crónicas, sol o en combinación con enfoques terapéuticos convencionales, particularmente para tratar anemias de origen multifactorial.

Las anemias hipoproliferativas pueden ser el resultado de insuficiencia o disfunción primaria de la médula ósea, en lugar de disfunción secundaria a inflamación, infección, o progresión del cáncer. Ejemplos destacados serían mielosupresión provocada por fármacos quimioterápicos contra el cáncer o radioterapia contra el cáncer. Una amplia revisión de ensayos clínicos halló que puede producirse anemia leve en el 100 % de los pacientes después de la quimioterapia, mientras que puede producirse anemia más grave en hasta el 80 % de tales pacientes (Groopman *et al.*, 1999, *J Natl Cancer Inst* 91:1616-1634). Los fármacos mielosupresores incluyen: 1) agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno (por ejemplo, melfalán) y nitrosoureas (por ejemplo, estreptozocina); 2) antimetabolitos tales como antagonistas del ácido fólico (por ejemplo, metotrexato), análogos de purina (por ejemplo, tioguanina) y análogos de pirimidina (por ejemplo, gemcitabina); 3) antibióticos citotóxicos tales como antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina); 4) inhibidores de cinasas (por ejemplo, gefitinib); 5) inhibidores mitóticos tales como taxanos (por ejemplo, paclitaxel) y alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinorelbina); 6) anticuerpos monoclonales (por ejemplo, rituximab); y 7) inhibidores de topoisomerasas (por ejemplo, topotecán y etopósido). Tal como se demuestra en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia (véase el ejemplo a continuación), puede usarse un polipéptido trampa de GDF, opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO, para tratar la anemia provocada por agentes quimioterápicos y/o radioterapia.

40 Los polipéptidos trampa de GDF, opcionalmente en combinación con un activador del receptor de EPO, también serían apropiados para tratar anemias de maduración desordenada de RBC, que se caracterizan en parte por RBC infradimensionados (microcíticos), sobredimensionados (macrocíticos), deformes, o anómalamente coloreados (hipocrómicos).

Los polipéptidos trampa de GDF pueden usarse en combinación (por ejemplo, administrarse en el mismo momento o en momentos diferentes, pero generalmente de tal manera que consigan efectos farmacológicos solapantes) con terapias complementarias para la eritropoyesis ineficaz. Tales terapias incluyen transfusión de glóbulos rojos o sangre completa para tratar la anemia. En anemias crónicas o hereditarias, los mecanismos normales para la homeostasis de hierro se ven abrumados por transfusiones repetidas, lo que eventualmente conduce a una acumulación de hierro tóxico y potencialmente mortal en tejidos vitales tales como el corazón, el hígado, y las glándulas endocrinas. Por tanto, las terapias complementarias para pacientes afectados crónicamente por eritropoyesis ineficaz también incluyen el tratamiento con una o más moléculas quelantes de hierro para fomentar la excreción de hierro en la orina y/o las heces y prevenir, o revertir, de ese modo la hemocromatosis tisular (Hershko, 2006, *Haematologica* 91:1307-1312; Cao *et al.*, 2011, *Pediatr Rep* 3(2):e17). Los agentes quelantes de hierro eficaces deben ser capaces de unirse a, y neutralizar, selectivamente el hierro férrico, la forma oxidada del hierro no unido a transferrina que probablemente representa la mayor toxicidad por hierro a través de la producción catalítica de radicales hidroxilo y productos de oxidación (Esposito *et al.*, 2003, *Blood* 102:2670-2677). Estos agentes son estructuralmente diversos, pero todos ellos presentan átomos donadores de oxígeno o nitrógeno capaces de formar complejos de coordinación octaedríticos neutralizantes con átomos de hierro individuales en estequiométrias de 1:1 (agentes hexadentados), 2:1 (tridentados), o 3:1 (bidentados) (Kalinowski *et al.*, 2005, *Pharmacol Rev* 57:547-583). Los agentes quelantes de hierro eficaces también tienen un peso molecular relativamente bajo (menor de 700 Dalton), con una solubilidad tanto en agua como en lípido que permita el acceso a los tejidos afectados. Ejemplos específicos de moléculas quelantes de hierro son deferoxamina, un agente hexadentado de origen bacteriano que requiere administración parenteral diaria, y los agentes sintéticos oralmente activos deferiprona (bidentado) y deferasirox (tridentado). La terapia de combinación que consiste en la administración en el mismo día de dos agentes quelantes de hierro es prometedora en pacientes que no responden a la monoterapia de quelación y también en superar problemas de un cumplimiento por parte del paciente deficiente con deferoxamina sola (Cao *et al.*, 2011, *Pediatr Rep* 3(2):e17; Galanello *et al.*, 2010, *Ann NY Acad Sci* 1202:79-86).

- 5 Los polipéptidos trampa de GDF pueden usarse en combinación con agonistas de hepcidina para la eritropoyesis ineficaz. La hepcidina, un polipéptido circulante producido principalmente en el hígado, se considera un regulador maestro del metabolismo de hierro en virtud de su capacidad para inducir la degradación de ferroportina, una proteína exportadora de hierro localizada en enterocitos, hepatocitos y macrófagos absorbentes. En términos generales, la hepcidina reduce la disponibilidad de hierro extracelular, por lo que los agonistas de hepcidina pueden ser beneficiosos en el tratamiento de la eritropoyesis ineficaz (Nemeth, 2010, Adv Hematol 2010:750643). Esta visión está respaldada por los efectos beneficiosos de la expresión de hepcidina aumentada en un modelo de ratón de β-talasemia (Gardenghi *et al.*, 2010, J Clin Invest 120:4466-4477).
- 10 10 Adicionalmente, tal como se muestra en el presente documento, los polipéptidos trampa de GDF pueden usarse en combinación con activadores del receptor de EPO para conseguir un aumento de los glóbulos rojos a menores intervalos de dosis. Esto puede ser beneficioso para reducir los efectos inespecíficos conocidos y los riesgos asociados con las altas dosis de activadores del receptor de EPO. También se describen en el presente documento, 15 aunque no están cubiertos por las reivindicaciones, métodos para tratar o prevenir la anemia en un individuo que lo necesita mediante la administración, al individuo, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido trampa de GDF o una combinación (o terapia concomitante) de un polipéptido trampa de GDF y un activador del receptor de EPO. Estos métodos pueden usarse para tratamientos terapéuticos y profilácticos de mamíferos, y particularmente seres humanos.
- 20 20 Los polipéptidos trampa de GDF pueden usarse en combinación con activadores del receptor de EPO para reducir la dosis requerida de estos activadores en pacientes que son susceptibles a los efectos adversos de la EPO. Los principales efectos adversos de la EPO son un aumento excesivo en los niveles de hematocrito o hemoglobina y policitemia. Unos niveles elevados de hematocrito pueden conducir a hipertensión (más particularmente agravamiento de la hipertensión) y trombosis vascular. Otros efectos adversos de la EPO que se han notificado, 25 algunos de ellos relacionados con la hipertensión, son cefaleas, síndrome similar a la gripe, obstrucción de las derivaciones, infartos de miocardio y convulsiones cerebrales debido a trombosis, encefalopatía hipertensiva, y aplasia de glóbulos rojos (Singibarti, (1994) J. Clin Investig 72 (supl. 6), S36-S43; Horl *et al.* (2000) Nephrol Dial Transplant 15 (supl. 4), 51-56; Delanty *et al.* (1997) Neurology 49, 686-689; Bunn (2002) N Engl J Med 346(7), 522-30 523).
- 30 30 El rápido efecto sobre los niveles de glóbulos rojos de los polipéptidos trampa de GDF dados a conocer en el presente documento indica que estos agentes actúan por un mecanismo diferente al de la EPO. Por consiguiente, estos antagonistas pueden ser útiles para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes que no responden bien a la EPO. Por ejemplo, un polipéptido trampa de GDF puede ser beneficioso para un paciente en el que la administración de una dosis de normal a aumentada (>300 UI/kg/semana) de EPO no da como resultado el aumento del nivel de hemoglobina hasta el nivel diana. Se encuentran pacientes con una respuesta inadecuada a la EPO para todos los tipos de anemia, pero se han observado mayores números de pacientes que no responden de manera particularmente frecuente entre pacientes con cánceres y pacientes con enfermedad renal en estadio terminal. Una respuesta inadecuada a la EPO puede ser o bien constitutiva (es decir, observada tras el primer tratamiento con EPO) o bien adquirida (por ejemplo, observada tras el tratamiento repetido con EPO).
- 40 40 Los pacientes pueden tratarse con una pauta posológica destinada a restablecer al paciente a un nivel de hemoglobina diana, habitualmente entre aproximadamente 10 g/dl y aproximadamente 12,5 g/dl, y normalmente de 45 45 aproximadamente 11,0 g/dl (véase también Jacobs *et al.* (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 15-19), aunque menores niveles diana pueden provocar menos efectos secundarios cardiovasculares. Alternativamente, pueden usarse los niveles de hematocrito (porcentaje del volumen de una muestra de sangre ocupado por las células) como una medida para el estado de los glóbulos rojos. Los niveles de hematocrito para individuos sanos oscilan entre el 50 50 41 y el 51 % para varones adultos y entre el 35 y el 45 % para mujeres adultas. Los niveles de hematocrito diana son habitualmente de alrededor del 30-33 %. Además, los niveles de hemoglobina/hematocrito varían de persona a persona. Por tanto, ópticamente, el nivel de hemoglobina/hematocrito diana puede individualizarse para cada paciente.
- 55 55 También se describen en el presente documento, aunque no están cubiertos por las reivindicaciones, métodos para el manejo de un paciente que se ha tratado con, o es un candidato para tratarse con, un polipéptido trampa de GDF mediante la medición de uno o más parámetros hematológicos en el paciente. Los parámetros hematológicos pueden usarse para evaluar la dosificación apropiada para un paciente que es un candidato para tratarse con un polipéptido trampa de GDF, para monitorizar los parámetros hematológicos durante el tratamiento con un polipéptido trampa de GDF, para evaluar si ajustar la dosificación durante el tratamiento con un polipéptido trampa de GDF, y/o 60 60 para evaluar una dosis de mantenimiento apropiada de un polipéptido trampa de GDF. Si uno o más de los parámetros hematológicos están fuera del nivel normal, la dosificación con un polipéptido trampa de GDF puede reducirse, retrasarse o terminarse.
- 65 65 Los parámetros hematológicos que pueden medirse según los métodos proporcionados en el presente documento incluyen, por ejemplo, niveles de glóbulos rojos, tensión arterial, reservas de hierro, y otros agentes encontrados en los líquidos corporales que se correlacionan con niveles aumentados de glóbulos rojos, usando métodos

reconocidos en la técnica. Tales parámetros pueden determinarse usando una muestra de sangre de un paciente. Aumentos de los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina, y/o los niveles de hematocrito pueden provocar aumentos de la tensión arterial.

- 5 Si uno o más parámetros hematológicos están fuera del intervalo normal, o en el lado alto de lo normal, en un paciente que es candidato para tratarse con un polipéptido trampa de GDF, entonces el inicio de la administración del polipéptido trampa de GDF puede retrasarse hasta que los parámetros hematológicos hayan vuelto a un nivel normal o aceptable, ya sea de manera natural o mediante intervención terapéutica. Por ejemplo, si un paciente candidato es hipertenso o prehipertenso, entonces el paciente puede tratarse con un agente reductor de la tensión arterial con el fin de reducir la tensión arterial del paciente. Puede usarse cualquier agente reductor de la tensión arterial apropiado para la afección del paciente individual, incluyendo, por ejemplo, diuréticos, inhibidores adrenérgicos (incluyendo bloqueantes alfa y bloqueantes beta), vasodilatadores, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), o bloqueadores del receptor de angiotensina II. La tensión arterial puede tratarse alternativamente usando un régimen de dieta y ejercicio. De manera similar, si un paciente candidato tiene reservas de hierro que son menores de lo normal, o en el lado bajo de lo normal, entonces el paciente puede tratarse con un régimen de dieta apropiado y/o complementos de hierro hasta que las reservas de hierro del paciente hayan vuelto a un nivel normal o aceptable. Para pacientes que tienen niveles de glóbulos rojos y/o niveles de hemoglobina mayores de lo normal, entonces la administración del polipéptido trampa de GDF puede retrasarse hasta que los niveles hayan vuelto a un nivel normal o aceptable.
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
- Si uno o más parámetros hematológicos están fuera del intervalo normal, o en el lado alto de lo normal, en un paciente que es candidato para tratarse con un polipéptido trampa de GDF, entonces el inicio de la administración no puede retrasarse. Sin embargo, la cantidad de dosificación o frecuencia de dosificación del polipéptido trampa de GDF puede establecerse en una cantidad que reduciría el riesgo de un aumento inaceptable de los parámetros hematológicos que surge tras la administración del polipéptido trampa de GDF. Alternativamente, puede desarrollarse un régimen terapéutico para el paciente que combina un polipéptido trampa de GDF con un agente terapéutico que aborda el nivel indeseable del parámetro hematológico. Por ejemplo, si el paciente tiene tensión arterial elevada, entonces puede diseñarse un régimen terapéutico que implica la administración de un polipéptido trampa de GDF y un agente reductor de la tensión arterial. Para un paciente que tiene reservas de hierro menores de lo deseado, puede desarrollarse un régimen terapéutico de un polipéptido trampa de GDF y complementación de hierro.

- Puede(n) establecerse parámetro(s) de nivel inicial para uno o más parámetros hematológicos para un paciente que es candidato para tratarse con un polipéptido trampa de GDF y establecer una pauta posológica apropiada para ese paciente basándose en valor(es) de nivel inicial. Alternativamente, pueden usarse los parámetros de nivel inicial establecidos basándose en el historial médico del paciente para informar sobre una pauta posológica de polipéptido trampa de GDF apropiada para un paciente. Por ejemplo, si un paciente sano tiene una lectura de tensión arterial de nivel inicial establecida que es superior al intervalo normal definido, puede no ser necesario llevar la tensión arterial del paciente al intervalo que se considera normal para la población general antes del tratamiento con el polipéptido trampa de GDF. Los valores de nivel inicial de un paciente para uno o más parámetros hematológicos antes del tratamiento con un polipéptido trampa de GDF también pueden usarse como valores comparativos relevantes para monitorizar cualquier cambio en los parámetros hematológicos durante el tratamiento con el polipéptido trampa de GDF.
- 45 Pueden medirse uno o más parámetros hematológicos en pacientes que están tratándose con un polipéptido trampa de GDF. Los parámetros hematológicos pueden usarse para monitorizar al paciente durante el tratamiento y permitir el ajuste o la terminación de la dosificación con el polipéptido trampa de GDF o una dosificación adicional con otro agente terapéutico. Por ejemplo, si la administración de un polipéptido trampa de GDF da como resultado un aumento de la tensión arterial, el nivel de glóbulos rojos, o el nivel de hemoglobina, o una reducción de las reservas de hierro, entonces la dosis del polipéptido trampa de GDF puede reducirse en cuanto a cantidad o frecuencia con el fin de disminuir los efectos del polipéptido trampa de GDF sobre el uno o más parámetros hematológicos. Si la administración de un polipéptido trampa de GDF da como resultado un cambio en uno o más parámetros hematológicos que es adverso para el paciente, entonces puede terminarse la dosificación del polipéptido trampa de GDF de manera temporal, hasta que el/los parámetro(s) hematológico(s) vuelva(n) a un nivel aceptable, o de manera permanente. De manera similar, si uno o más parámetros hematológicos no se llevan a un intervalo aceptable después de reducir la dosis o frecuencia de administración del polipéptido trampa de GDF, entonces puede terminarse la dosificación. Como alternativa a, o además de, reducir o terminar la dosificación con el polipéptido trampa de GDF, el paciente puede dosificarse con un agente terapéutico adicional que aborda el nivel indeseable en el/los parámetro(s) hematológico(s), tal como, por ejemplo, un agente reductor de la tensión arterial o un complemento de hierro. Por ejemplo, si un paciente que está tratándose con un polipéptido trampa de GDF tiene una tensión arterial elevada, entonces puede continuar la dosificación con el polipéptido trampa de GDF al mismo nivel y se añade un agente reductor de la tensión arterial al régimen de tratamiento, puede reducirse la dosificación con el polipéptido trampa de GDF (por ejemplo, en cuanto a cantidad y/o frecuencia) y se añade un agente reductor de la tensión arterial al régimen de tratamiento, o puede terminarse la dosificación con el polipéptido trampa de GDF y puede tratarse al paciente con un agente reductor de la tensión arterial.
- 50
- 55
- 60
- 65

6. Composiciones farmacéuticas

- Los compuestos (por ejemplo, polipéptidos trampa de GDF) pueden formularse con un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido trampa de GDF puede administrarse solo o como componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos objeto pueden formularse para su administración de cualquier manera conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria.
- El método terapéutico puede incluir administrar la composición por vía sistémica, o por vía local como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en esta invención está, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos. Pueden administrarse agentes terapéuticamente útiles distintos de los polipéptidos trampa de GDF que también pueden incluirse opcionalmente en la composición tal como se describió anteriormente de manera simultánea o secuencial con los compuestos objeto (por ejemplo, polipéptidos trampa de GDF) en los métodos de la invención.
- Normalmente, los compuestos se administrarán por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos trampa de GDF en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hace que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.
- Además, la composición puede encapsularse o inyectarse en una forma para administración a un sitio de tejido diana (por ejemplo, médula ósea). Las composiciones pueden incluir una matriz capaz de administrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos trampa de GDF) a un sitio de tejido diana (por ejemplo, médula ósea), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y que puede reabsorberse óptimamente en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos trampa de GDF. Tales matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.
- La elección del material de matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, la apariencia cosmética y las propiedades de interfaz. La aplicación particular de las composiciones objeto definirá la formulación apropiada. Las posibles matrices para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato de tricalcio, hidroxiapatita, polí(ácido láctico) y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros posibles materiales son biodegradables y están biológicamente bien definidos, tales como colágeno óseo o dérmico. Otras matrices están compuestas por proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras posibles matrices no son biodegradables y están químicamente definidas, tales como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos, u otros materiales cerámicos. Las matrices pueden estar compuestas por combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como polí(ácido láctico) e hidroxiapatita o colágeno y fosfato de tricalcio. Los materiales biocerámicos pueden alterarse en cuanto a composición, tal como en aluminato-fosfato de calcio, y procesamiento para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de partícula, y la biodegradabilidad.
- Los compuestos de la invención pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente como principio activo. Un agente también puede administrarse como un bolo, un electuario o una pasta.
- En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y similares), pueden mezclarse uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes dispersantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos, y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes de humectación, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden

comprender agentes tamponantes. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

- 5 Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes de humectación, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.
- 10
- 15 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen-sorbitol, y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.
- 20 Las composiciones de la invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes de humectación, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sóblico, y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.
- 25

Se entiende que el médico responsable determinará la pauta posológica considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos objeto de la invención (por ejemplo, polipéptidos trampa de GDF). Los diversos factores incluyen, pero no se limitan a, el recuento de glóbulos rojos, el nivel de hemoglobina u otras evaluaciones de diagnóstico del paciente, el recuento de glóbulos rojos diana deseado, la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda contribuir a un nivel de glóbulos rojos reducido, el tiempo de administración, y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar a la dosificación. El progreso puede monitorizarse mediante la evaluación periódica de los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina, así como mediante evaluaciones de los niveles de reticulocitos y otros indicadores del proceso hematopoyético.

También se describe en el presente documento, aunque no está cubierta por las reivindicaciones, la terapia génica para la producción *in vivo* de polipéptidos trampa de GDF. Tal terapia conseguiría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótido trampa de GDF en células o tejidos que tienen los trastornos tal como se enumeraron anteriormente. La administración de secuencias de polinucleótido trampa de GDF puede conseguirse usando un vector de expresión recombinante tal como un virus químérico o un sistema de dispersión coloidal. Para la administración terapéutica de secuencias de polinucleótido trampa de GDF se prefiere el uso de liposomas dirigidos.

45 Diversos vectores virales que pueden utilizarse para la terapia génica tal como se enseña en el presente documento incluyen adenovirus, virus del herpes, virus de la vaccinia, o un virus de ARN tal como un retrovirus. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que puede insertarse un gen exógeno individual incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que las células transducidas puedan identificarse y generarse. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de la diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido, o una proteína. El direccionamiento preferido se consigue usando un anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden insertarse secuencias de polinucleótidos específicas en el genoma retroviral o unirse a una envoltura viral para permitir la administración específica diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido trampa de GDF.

60 Alternativamente, las células de histocultivo pueden transfectarse directamente con plásmidos que codifican para los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección con fosfato de calcio convencional. Estas células se transfectan entonces con el plásmido de vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

65 Otro sistema de administración dirigida para polinucleótidos trampa de GDF es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas. El

- 5 sistema coloidal preferido de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y administrarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley, *et al.*, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los métodos para la transferencia génica eficiente usando un vehículo de liposoma se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, Mannino *et al.*, Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma es normalmente una combinación de fosfolípidos, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También pueden usarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la fuerza iónica, y de la presencia de cationes divalentes.
- 10 Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilsérina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos, y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina, y diestearoilfosfatidilcolina. El direccionamiento de liposomas también es posible basándose en, por ejemplo, la especificidad de órgano, la especificidad de célula y la especificidad de orgánulo y se conoce en la técnica.
- 15

Ejemplificación

La invención, que se describe ahora de manera general, se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con propósitos de ilustración de determinadas realizaciones y 20 realizaciones de la presente invención, y no se pretende que limiten la invención.

Ejemplo 1. Generación de una trampa de GDF

25 Los solicitantes construyeron una trampa de GDF tal como sigue. Se fusionó un polipéptido que tenía un dominio extracelular de ActRIIB modificado con unión a activina A muy reducida en relación con GDF11 y/o miostatina (como consecuencia de una sustitución de leucina por aspartato en la posición 79 en SEQ ID NO: 1) con un dominio Fc humano o de ratón con un ligador mínimo (tres aminoácidos glicina) entremedias. Los constructos se denominan ActRIIB(L79D 20-134)-hFc y ActRIIB(L79D 20-134)-mFc, respectivamente. Formas alternativas con un glutamato en lugar de un aspartato en la posición 79 funcionaron de manera similar (L79E). A continuación, también se generaron 30 formas alternativas con una alanina en lugar de una valina en la posición 226 con respecto a SEQ ID NO: 7, y funcionaron de manera equivalente en todos los aspectos sometidos a prueba. El aspartato en la posición 79 (en relación con SEQ ID NO: 1, o en la posición 60 en relación con SEQ ID NO: 7) está resaltado en gris a continuación. La valina en la posición 226 en relación con SEQ ID NO: 7 también está resaltada en gris a continuación.

35 A continuación se muestra la trampa de GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc tal como se purifica a partir de líneas de células CHO (SEQ ID NO: 7).

GRGEAETRECIYYNANWELETNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
 GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPT
APGGGHTCPCPAELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTKAKGQPQREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

40 La porción derivada de ActRIIB de la trampa de GDF tiene una secuencia de aminoácidos expuesta a continuación (SEQ ID NO: 32), y esa porción puede usarse como monómero o como una proteína de fusión no Fc como monómero, dímero o complejo de orden superior.

GRGEAETRECIYYNANWELETNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE
 LVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYE
PPPTAPT (SEQ ID NO: 32)

45 La proteína trampa de GDF se expresó en líneas de células CHO. Se consideraron tres secuencias líder diferentes:

- (i) Melitina de abeja melífera (HBML): MKFLVNVALVFMVYYISYIYA (SEQ ID NO: 8)
- 50 (ii) Activador tisular del plasminógeno (TPA): MDAMKRLGCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)
- (iii) Nativa: MTAPWWVALALLWGSLCAGS (SEQ ID NO: 10).

La forma seleccionada emplea el líder de TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos no procesada:

MDAMKRLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

5

Este polipéptido está codificado por la siguiente secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 12):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT
 CGCCCGGGCGC CTCTGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA
 ACTGGGAGCT GGAGCGCAC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
 AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA
 AGGGCTGCTG GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACCTC
 ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CGGAAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCCACCG
 GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG
 TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAAC TGCTACGTGG
 ACGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
 ACCCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGCTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 ATGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGGCCA
 AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCAGGAG GAGATGACCA
 AGAACCCAGGT CAGCGTGGTCA TGGCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CGGGAGAACCA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT
 CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

10

Pudo conseguirse la purificación mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q Sepharose, cromatografía de fenil-Sepharose, cromatografía de exclusión molecular, y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación pudo completarse con filtración viral e intercambio de tampón. En un ejemplo de un esquema de purificación, el medio de cultivo celular se hace pasar a lo largo de una columna de proteína A, se lava en Tris 150 mM/NaCl (pH 8,0), luego se lava en Tris 50 mM/NaCl (pH 8,0) y se eluye con glicina 0,1 M, pH 3,0. El eluato de bajo pH se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos como etapa de aclaramiento viral. Luego se neutraliza el eluato y se hace pasar a lo largo de una columna de intercambio iónico de Q Sepharose y se lava en Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, y se eluye en Tris 50 mM pH 8,0, con una concentración de NaCl de entre 150 mM y 300 mM. Luego se cambia el eluato a Tris 50 mM pH 8,0, sulfato de amonio 1,1 M y se hace pasar a lo largo de una columna de fenil-Sepharose, se lava, y se eluye en Tris 50 mM pH 8,0 con sulfato de amonio entre 150 y 300 mM. El eluato se dializa y se filtra antes de su uso.

15

Se describen trampas de GDF adicionales (proteínas de fusión ActRIIB-Fc modificadas para reducir la razón de unión a activina A en relación con miostatina o GDF11) en los documentos PCT/US2008/001506 y WO 2006/012627.

Ejemplo 2. Bioensayo para la señalización mediada por GDF-11 y activina

20

Se usó un ensayo de gen indicador A-204 para evaluar los efectos de proteínas de ActRIIB-Fc y trampas de GDF sobre la señalización por GDF-11 y activina A. Línea celular: rabdomiosarcoma humano (derivado de músculo). Vector indicador: pGL3(CAGA)12 (descrito en Dennler *et al.*, 1998, EMBO 17: 3091-3100). El motivo CAGA12 está presente en genes sensibles a TGF-beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para factores que señalan a través de Smad2 y Smad3.

35

Día 1: dividir las células A-204 en placas de 48 pocillos.

Día 2: transfectar las células A-204 con 10 µg de pGL3(CAGA)12 o pGL3(CAGA)12 (10 µg) + pRLCMV (1 µg) y Fugene.

Día 3: añadir factores (diluidos en medio + BSA al 0,1 %). Fue necesario incubar previamente los inhibidores con los factores durante 1 h antes de su adición a las células. 6 h después, aclarar las células con PBS, y lisar las células.

- 5 A esto le sigue un ensayo de luciferasa. En ausencia de cualquier inhibidor, la activina A mostró una estimulación de 10 veces de la expresión del gen indicador y una DE₅₀ de ~2 ng/ml. GDF-11: estimulación de 16 veces, DE₅₀: ~1,5 ng/ml.
- 10 ActRIIB(20-134) es un potente inhibidor de la actividad de activina, GDF-8 y GDF-11 en este ensayo. Las variantes también se sometieron a prueba en este ensayo.

Ejemplo 3. Inhibición de GDF-11 mediante truncamientos N-terminales y C-terminales

- 15 Se generaron variantes de ActRIIB(20-134)-hFc con truncamientos en el extremo N-terminal y/o C-terminal y se sometieron a prueba para determinar la actividad como inhibidores de GDF-11 y activina. A continuación se muestran las actividades (tal como se miden en medios acondicionados):

Truncamientos de ActRIIB-hFc C-terminales:

	CI ₅₀ (ng/ml)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB(20-134)-hFc	45	22
ActRIIB(20-132)-hFc	87	32
ActRIIB(20-131)-hFc	120	44
ActRIIB(20-128)-hFc	130	158

20 Tal como puede observarse, los truncamientos de tres (que terminan con ...PPT), seis (que terminan con ...YEP) o más aminoácidos en el extremo C-terminal provocan una disminución de tres veces o mayor en la actividad de la molécula. El truncamiento de los 15 aminoácidos finales de la porción ActRIIB provoca una mayor pérdida de actividad (véase el documento WO2006/012627).

25 Se realizaron truncamientos amino-terminales en la estructura de una proteína de ActRIIB(20-131)-hFc. A continuación se muestran las actividades (tal como se miden en medios acondicionados):

30 Truncamientos de ActRIIB-hFc N-terminales:

	CI ₅₀ (ng/ml)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB(20-131)-hFc (GRG...)	183	201
ActRIIB(21-131)-hFc (RGE...)	121	325
ActRIIB(22-131)-hFc (GEA...)	71	100
ActRIIB(23-131)-hFc (EAE...)	60	43
ActRIIB(24-131)-hFc (AET...)	69	105

35 Por consiguiente, los truncamientos de dos, tres o cuatro aminoácidos a partir del extremo N-terminal conducen a la producción de una proteína más activa que las versiones con un dominio extracelular de longitud completa. Experimentos adicionales muestran que un truncamiento de cinco aminoácidos, ActRIIB(25-131)-hFc, tiene una actividad equivalente a la forma no truncada, y delecciones adicionales en el extremo N-terminal continúan degradando la actividad de la proteína. Por tanto, los constructos óptimos tendrán un extremo C-terminal que termina entre los aminoácidos 133-134 de SEQ ID NO: 1 y un extremo N-terminal que comienza en los aminoácidos 22-24 de SEQ ID NO: 1. Un extremo N-terminal correspondiente a los aminoácidos 21 ó 25 proporcionará una actividad que es similar a la del constructo ActRIIB(20-134)-hFc. Estos truncamientos también pueden usarse en el contexto de trampas de GDF, tales como una variante L79D o L79E.

Ejemplo 4. Variantes de ActRIIB-Fc, actividad basada en células

40 Se sometió a prueba la actividad de proteínas de ActRIIB-Fc y trampas de GDF en un ensayo basado en células, tal como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la tabla a continuación. Algunas variantes se sometieron a prueba en diferentes constructos con truncamiento C-terminal. Tal como se comentó anteriormente, los

truncamientos de cinco o quince aminoácidos provocaron una reducción de la actividad. Las trampas de GDF (variantes L79D y L79E) mostraron una pérdida sustancial de unión a activina, mientras que conservaron prácticamente la inhibición de tipo natural de GDF-11.

5 Unión de ActRIIB-Fc soluble a GDF11 y activina A:

Variaciones de ActRIIB-Fc	Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de SEQ ID NO: 1)	Actividad de inhibición de GDF11	Actividad de inhibición de activina
R64	20-134	+++ (K_i de aproximadamente 10^{-8} M)	+++ (K_i de aproximadamente 10^{-8} M)
A64	20-134	+ (K_i de aproximadamente 10^{-6} M)	+ (K_i de aproximadamente 10^{-6} M)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+

+ actividad deficiente (K_i de aproximadamente 1×10^{-6})
++ actividad moderada (K_i de aproximadamente 1×10^{-7})
+++ actividad buena (de tipo natural) (K_i de aproximadamente 1×10^{-8})
++++ mayor que la actividad de tipo natural

Se han evaluado varias variantes para determinar la semivida sérica en ratas. ActRIIB(20-134)-Fc tiene una semivida sérica de aproximadamente 70 horas. ActRIIB(A24N 20-134)-Fc tiene una semivida sérica de aproximadamente 100-150 horas. La variante A24N tiene actividad en el ensayo basado en células (anterior) y en ensayos *in vivo* (a continuación) que es equivalente a la molécula de tipo natural. Junto con una semivida más prolongada, esto significa que, a lo largo del tiempo, una variante A24N proporcionará un mayor efecto por unidad de proteína que la molécula de tipo natural. La variante A24N, y cualquiera de las demás variantes sometidas a prueba anteriormente, puede combinarse con las moléculas trampa de GDF, tales como las variantes L79D o L79E.

10 Ejemplo 5. Unión a GDF-11 y activina A

Se sometió a prueba la unión de determinadas proteínas de ActRIIB-Fc y trampas de GDF a ligandos en un ensayo BiaCore™.

20 Las variantes de ActRIIB-Fc o la proteína de tipo natural se capturaron en el sistema usando un anticuerpo anti-hFc. Se inyectaron los ligandos y se hicieron fluir a lo largo de las proteínas receptoras capturadas. A continuación se resumen los resultados en las tablas.

25 Especificidad de unión al ligando de variantes de IIB.

	GDF11		
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	1,34e-6	1,13e-4	8,42e-11

ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1,21e-6	6,35e-5	5,19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6,7e-5	4,39e-4	6,55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3,8e-5	2,74e-4	7,16e-10
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6,77e-5	2,41e-5	3,56e-11
GDF8			
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	3,69e-5	3,45e-5	9,35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3,85e-5	8,3e-4	2,15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3,74e-5	9e-4	2,41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2,25e-5	4,71e-5	2,1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9,74e-4	2,09e-4	2,15e-9
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1,08e-5	1,8e-4	1,67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2,8e-5	2,03e-5	7,18e-11
Activina A			
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	5,94e6	1,59e-4	2,68e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3,34e6	3,46e-4	1,04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc			Baja unión
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc			Baja unión
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6,82e6	3,25e-4	4,76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7,46e6	6,28e-4	8,41e-11
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5,02e6	4,17e-4	8,31e-11

Estos datos confirman los datos del ensayo basado en células, demostrando que la variante A24N conserva una actividad de unión al ligando que es similar a la de la molécula ActRIIB(20-134)-hFc, y que la molécula L79D o L79E conserva la unión a miostatina y GDF11, pero muestra una unión a activina A considerablemente disminuida (no cuantificable).

5 Se han generado y sometido a prueba otras variantes, tal como se notifica en el documento WO2006/012627, véanse, por ejemplo, las págs. 59-60, usando ligandos acoplados al dispositivo y haciendo fluir el receptor a lo largo de los ligandos acoplados. Notablemente, K74Y, K74F, K74I (y supuestamente otras sustituciones hidrófobas en K74, tales como K74L) y D80I provocan una disminución de la razón de unión a activina A con respecto a la unión a GDF11, en relación con la molécula K74 de tipo natural. A continuación se reproduce una tabla de datos con respecto a estas variantes:

Variantes de ActRIIB-Fc solubles que se unen a GDF11 y activina A (ensayo BiaCore™)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1,8e-7 M (+)	KD=2,6e-7 M (+)
WT (64R)	na	KD=8,6e-8 M (+++)
+15cola	KD ~2,6 e-8 M (+++)	KD=1,9e-8 M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*

K74A	KD=4,35e-9 M	KD=5,3e-9 M
K74Y	*	
K74F	*	
K74I	*	
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

* no se observó unión
-- unión < 1/5 WT
- unión ~1/2 WT
+ WT
++ unión aumentada <2x
+++ unión aumentada ~5x
++++ unión aumentada ~10x
+++++ unión aumentada ~40x

Ejemplo 6. ActRIIB-hFc estimula la eritropoyesis en primates no humanos

Se administró ActRIIB(20-134)-hFc (IgG1) una vez a la semana durante 1 mes a macacos cangrejeros macho y hembra mediante inyección subcutánea. Se asignaron cuarenta y ocho macacos cangrejeros (24/sexo) a uno de cuatro grupos de tratamiento (6 animales/sexo/grupo) y se les administraron por vía subcutánea inyecciones de o bien vehículo o bien ActRIIB-hFc a 3, 10 ó 30 mg/kg una vez a la semana durante 4 semanas (un total de 5 dosis). Los parámetros evaluados incluían la patología clínica general (hematología, bioquímica clínica, coagulación, y análisis de orina). ActRIIB-hFc provocó valores de reticulocitos absolutos medios elevados de manera estadísticamente significativa el día 15 en animales tratados. El día 36, ActRIIB-hFc provocó varios cambios hematológicos, incluyendo valores de anchura de distribución de reticulocitos y glóbulos rojos absolutos medios elevados y una menor concentración media de hemoglobina corpuscular. Se vieron afectados todos los grupos tratados y ambos sexos. Estos efectos son compatibles con un efecto positivo de ActRIIB-hFc sobre la liberación de reticulocitos inmaduros a partir de la médula ósea. Este efecto se revirtió después del reposo farmacológico de los animales tratados (el día 56 del estudio). Por consiguiente, se concluyó que ActRIIB-hFc estimula la eritropoyesis.

Ejemplo 7. ActRIIB-mFc fomenta aspectos de la eritropoyesis en ratones mediante la estimulación de las actividades eritropoyéticas esplénicas

En este estudio se analizaron los efectos de la administración *in vivo* de ActRIIB(20-134)-mFc sobre la frecuencia de progenitores hematopoyéticos en médula ósea y bazo. A un grupo de ratones C57BL/6 se les inyectó PBS como control y a un segundo grupo de ratones se les administraron dos dosis de ActRIIB-mFc a 10 mg/kg, y ambos grupos se sacrificaron después de 8 días. Se usó sangre periférica para realizar recuentos sanguíneos completos y se usaron fémures y bazos para realizar ensayos clonogénicos *in vitro* para evaluar el contenido de células progenitoras linfoides, eritroides y mieloides en cada órgano. En el breve periodo de tiempo de este estudio, no se observaron cambios significativos en los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o glóbulos blancos en ratones tratados. En los fémures no hubo ninguna diferencia en los números de células nucleadas o en el contenido de progenitores entre los grupos de control y tratado. En los bazos, el grupo tratado con compuesto experimentó un aumento estadísticamente significativo del número de colonias de progenitores eritroides maduros (CFU-E) por placa, la frecuencia y el número de progenitores totales por bazo. Además, se observó un aumento del número de progenitores mieloides (CFU-GM), eritroides inmaduros (BFU-E) y totales por bazo.

Animales:

En este estudio se usaron dieciséis ratones C57BL/6 hembra de 6-8 semanas de edad. A ocho ratones se les inyectó por vía subcutánea el compuesto de prueba ActRIIB-mFc los días 1 y 3 a una dosis de 10 mg/kg y a ocho ratones se les inyectó por vía subcutánea control de vehículo, solución salina tamponada con fosfato (PBS), a un volumen de 100 µl por ratón. Todos los ratones se sacrificaron 8 días después de la primera inyección según las pautas para el cuidado de animales relevantes. Se extrajeron muestras de sangre periférica (PB) de los animales individuales mediante punción cardiaca y se usaron para determinar los recuentos sanguíneos completos con diferencial (CBC/Dif). Se recogieron los fémures y bazos de cada ratón.

Pruebas realizadas:

Recuentos CBC/Dif

Se recogió PB de cada ratón a través de punción cardiaca y se colocó en tubos Microtainer apropiados. Se enviaron las muestras a CLV para su análisis en un contador CellDyn 3500.

Ensayos clonogénicos

Se evaluaron progenitores clonogénicos de los linajes mieloide, eritroide y linfoide usando los sistemas de medio basado en metilcelulosa *in vitro* descritos a continuación.

Progenitores eritroides maduros:

Se cultivaron progenitores clonogénicos de los linajes eritroide maduro (CFU-E) en MetoCult™ 3334, un medio basado en metilcelulosa que contenía eritropoyetina humana recombinante (rh) (3 U/ml).

Progenitores linfoideos:

Se cultivaron progenitores clonogénicos del linaje linfoide (CFU-pre-B) en MetoCult® 3630, un medio basado en metilcelulosa que contenía interleucina 7 rh (10 ng/ml).

Progenitores mieloides y eritroides inmaduros:

Se cultivaron progenitores clonogénicos de los linajes granulocitos-monocitos (CFU-GM), eritroide (BFU-E) y multipotencial (CFU-GEMM) en MetoCult™ 3434, un medio basado en metilcelulosa que contenía factor de células madre murino recombinante (rm) (50 ng/ml), interleucina 6 rh (10 ng/ml), interleucina 3 rm (10 ng/ml) y eritropoyetina rh (3 U/ml).

Métodos:

Se procesaron los fémures y bazos de ratón mediante protocolos convencionales. Brevemente, se obtuvo la médula ósea lavando la cavidad femoral con medio de Dulbecco modificado por Iscove que contenía suero bovino fetal al 2 % (IMDM + FBS al 2 %) usando una aguja de calibre 21 y una jeringa de 1 cm³. Se obtuvieron células esplénicas triturando los bazos a través de un filtro de 70 µm y enjuagando el filtro con IMDM + FBS al 2 %. Luego se realizaron recuentos de células nucleadas en ácido acético glacial al 3 % en las suspensiones de células individuales usando una cámara de recuento Neubauer, de modo que pudieron calcularse las células totales por órgano. Para eliminar los glóbulos rojos contaminantes, luego se diluyeron las células esplénicas totales con 3 veces el volumen de tampón de lisis de cloruro de amonio y se incubaron sobre hielo durante 10 minutos. Luego se lavaron las células y se resuspendieron en IMDM + FBS al 2 % y se realizó un segundo recuento de células para determinar la concentración celular de las células después de la lisis.

Se prepararon reservas de células y se añadieron a cada formulación de medio basado en metilcelulosa para obtener las concentraciones de siembra óptimas para cada tejido en cada formulación de medio. Se sembraron células de médula ósea a 1×10^5 células por placa en MetoCult™ 3334 para evaluar los progenitores eritroides maduros, a 2×10^5 células por placa en MetoCult™ 3630 para evaluar los progenitores linfoideos y a 3×10^4 células por placa en MetoCult™ 3434 para evaluar los progenitores mieloides y eritroides inmaduros. Se sembraron células esplénicas a 4×10^5 células por placa en MetoCult™ 3334 para evaluar los progenitores eritroides maduros, a 4×10^5 células por placa en MetoCult™ 3630 para evaluar los progenitores linfoideos y a 2×10^5 células por placa en MetoCult™ 3434 para evaluar los progenitores mieloides y eritroides inmaduros. Se incubaron los cultivos sembrados en placas por triplicado a 37 °C, el 5 % de CO₂, hasta la enumeración de colonias y se realizó la evaluación por parte de personal cualificado. Los progenitores eritroides maduros se cultivaron durante 2 días, los progenitores linfoideos se cultivaron durante 7 días y los progenitores mieloides y eritroides maduros se cultivaron durante 12 días.

Análisis:

Se calculó la media +/- 1 desviación estándar para los cultivos por triplicado de los ensayos clonogénicos y para los

grupos de control y tratamiento para todos los conjuntos de datos.

Se calculó la frecuencia de células formadoras de colonias (CFC) en cada tejido tal como sigue:

5 Células sembradas por placa

Media de CFC puntuadas por placa

Se calcularon las CFC totales por fémur o bazo tal como sigue:

10 CFC totales puntuadas x recuento de células nucleadas por fémur o bazo (tras la lisis de RBC)

Número de células nucleadas cultivadas

15 Se realizaron pruebas de la t convencionales para evaluar si había diferencias en el número medio de células o progenitores hematopoyéticos entre los ratones de control de PBS y los ratones tratados con compuesto. Debido a la posible subjetividad de la enumeración de colonias, un valor de p de menos de 0,01 se considera significativo. Los valores medios (+/- DE) para cada grupo se muestran en las tablas a continuación.

20 Tabla: Parámetros hematológicos

Grupo de tratamiento	Glóbulos blancos ($\times 10^9/l$)	Glóbulos rojos ($\times 10^9/l$)	Hemoglobina (gAL)	Hematocrito (l/l)
PBS (n=8)	9,53 +/- 1,44	10,5 +/- 1,1	160,9 +/- 13,3	0,552 +/- 0,057
ActRIIB-mFc (n=8)	9,77 +/- 1,19	10,8 +/- 0,3	162,1 +/- 4,1	0,567 +/- 0,019

Tabla: CFC de fémur y bazo

Grupo de tratamiento	CFC totales por fémur	CFC totales por bazo	CFU-E totales por fémur	CFU-E totales por bazo
PBS (n=8)	88 +/- 10	54 +/- 14	156 +/- 27	131 +/- 71
ActRIIB-mFc (n=8)	85 +/- 9	79 +/- 6*	164 +/- 23	436 +/- 86*

* el análisis preliminar indica p < 0,05

25 El tratamiento de ratones con ActRIIB(20-134)-mFc, en el breve periodo de tiempo de este estudio, no dio como resultado aumentos significativos del contenido de glóbulos rojos o hemoglobina. Sin embargo, el efecto sobre el contenido de células progenitoras fue notable. En los fémures no hubo ninguna diferencia en los números de células nucleadas o el contenido de progenitores entre los grupos de control y tratado. En los bazos, el grupo tratado con compuesto experimentó un aumento estadísticamente significativo del número de células nucleadas antes de la lisis de glóbulos rojos y del número de colonias de progenitores eritroides maduros (CFU-E) por placa, la frecuencia y el número de progenitores totales por bazo. Además, se observó un aumento del número de progenitores mieloides (CFU-GM), eritroides inmaduros (BFU-E) y totales por bazo. Por consiguiente, se espera que, a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado, el tratamiento con ActRIIB(20-134)-mFc pueda dar como resultado un contenido elevado de glóbulos rojos y hemoglobina.

Ejemplo 8. Una trampa de GDF aumenta los niveles de glóbulos rojos *in vivo*

40 Se asignaron ratones C57BL/6NTac macho de doce semanas de edad a uno de dos grupos de tratamiento (N=10). Los ratones se dosificaron o bien con vehículo o bien con un polipéptido de ActRIIB variante ("trampa de GDF") [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc] mediante inyección subcutánea (s.c.) a 10 mg/kg dos veces por semana durante 4 semanas. Al terminar el estudio, se extrajo sangre completa mediante punción cardiaca en tubos que contenían EDTA y se analizó para determinar la distribución celular usando un analizador de hematología HM2 (Abaxis, Inc.).

45 Designación de grupos

Grupo	N	Ratones	Inyección	Dosis (mg/kg)	Vía	Frecuencia
1	10	C57BL/6	PBS	0	s.c.	Dos veces/semana
2	10	C57BL/6	Trampa de GDF [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc]	10	s.c.	Dos veces/semana

El tratamiento con la trampa de GDF no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo sobre el número de glóbulos blancos (WBC) en comparación con los controles de vehículo. Los números de glóbulos rojos (RBC) se aumentaron en el grupo tratado en relación con los controles (véase la tabla a continuación). Tanto el contenido de hemoglobina (HGB) como el hematocrito (HCT) también se aumentaron debido a los glóbulos rojos adicionales. La anchura promedio de los glóbulos rojos (RDWc) fue mayor en los animales tratados, lo que indica un aumento de la agrupación de glóbulos rojos inmaduros. Por tanto, el tratamiento con la trampa de GDF conduce a aumentos de los glóbulos rojos, sin efectos distinguibles sobre las poblaciones de glóbulos blancos.

Resultados de hematología

10

	RBC ($10^{12}/l$)	HGB (g/dl)	HCT (%)	RDWc (%)
PBS	$10,7 \pm 0,1$	$14,8 \pm 0,6$	$44,8 \pm 0,4$	$17,0 \pm 0,1$
Trampa de GDF	$12,4 \pm 0,4^{**}$	$17,0 \pm 0,7^*$	$48,8 \pm 1,8^*$	$18,4 \pm 0,2^{**}$

= p < 0,05, = p < 0,01

Ejemplo 9. Una trampa de GDF es superior a ActRIIB-Fc para aumentar los niveles de glóbulos rojos *in vivo*

Se asignaron aleatoriamente ratones C57BL/6NTac macho de diecinueve semanas de edad a uno de tres grupos. Los ratones se dosificaron con vehículo (solución salina tamponada con Tris, TBS, 10 mM), ActRIIB(20-134)-mFc de tipo natural o trampa de GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc mediante inyección subcutánea dos veces por semana durante tres semanas. Se extrajo sangre mediante punción cigomática en el nivel inicial y después de tres semanas de dosificación y se analizó para determinar la distribución celular usando un analizador de hematología (HM2, Abaxis, Inc.)

El tratamiento con ActRIIB-Fc o la trampa de GDF no tuvo ningún efecto significativo sobre los números de glóbulos blancos (WBC) en comparación con los controles de vehículo. El recuento de glóbulos rojos (RBC), el hematocrito (HCT) y los niveles de hemoglobina estaban todos ellos elevados en los ratones tratados con trampa de GDF en comparación con los controles o el constructo de tipo natural (véase la tabla a continuación). Por tanto, en una comparación directa, la trampa de GDF fomenta aumentos de los glóbulos rojos hasta un grado significativamente mayor que una proteína de ActRIIB-Fc de tipo natural. De hecho, en este experimento, la proteína de ActRIIB-Fc de tipo natural no provocó ningún aumento estadísticamente significativo de los glóbulos rojos, lo que sugiere que sería necesaria una dosificación más prolongada o más alta para revelar este efecto.

20
25
30

Resultados de hematología después de tres semanas de dosificación

	RBC ($10^{12}/ml$)	HCT (%)	HGB (g/dl)
TBS	$11,06 \pm 0,46$	$46,78 \pm 1,9$	$15,7 \pm 0,7$
ActRIIB-mFc	$11,64 \pm 0,09$	$49,03 \pm 0,3$	$16,5 \pm 1,5$
Trampa de GDF	$13,19 \pm 0,2^{**}$	$53,04 \pm 0,8^{**}$	$18,4 \pm 0,3^{**}$

** = p < 0,01

Ejemplo 10. Generación de una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado

Tal como se describe en el ejemplo 1, se generó una trampa de GDF denominada ActRIIB(L79D 20-134)-hFc mediante fusión N-terminal del líder de TPA al dominio extracelular de ActRIIB (residuos 20-134 en SEQ ID NO: 1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 en SEQ ID NO: 1) y fusión C-terminal del dominio Fc humano con ligador mínimo (tres residuos de glicina) (figura 3). En la figura 4 se muestra una secuencia de nucleótidos correspondiente a esta proteína de fusión.

40
45

Se generó una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado, denominada ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, mediante fusión N-terminal del líder de TPA al dominio extracelular truncado (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 en SEQ ID NO: 1) y fusión C-terminal del dominio Fc humano con ligador mínimo (tres residuos de glicina) (figura 5). En la figura 6 se muestra una secuencia de nucleótidos correspondiente a esta proteína de fusión.

Ejemplo 11. Unión selectiva al ligando mediante trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB doblemente truncado

50

Se evaluó *in vitro* la afinidad de trampas de GDF y otras proteínas de ActRIIB-hFc por varios ligandos con un instrumento Biacore™. Los resultados se resumen en la tabla a continuación. Se obtuvieron valores de Kd mediante ajuste de afinidad en estado estacionario debido a la muy rápida asociación y disociación del complejo, que previno

la determinación precisa de k_{on} y k_{off} .

Selectividad de ligando de las variantes de ActRIIB-hFc:

Constructo de fusión	Activina A (Kd e-11)	Activina B (Kd e-11)	GDF11 (Kd e-11)
ActRIIB(L79 20-134)-hFc	1,6	1,2	3,6
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	1350,0	78,8	12,3
ActRIIB(L79 25-131)-hFc	1,8	1,2	3,1
ActRIIB(L79D 25-131)-hFc	2290,0	62,1	7,4

5 La trampa de GDF con un dominio extracelular truncado, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, igualó o superó la selectividad de ligando mostrada por la variante más larga, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc, con una pérdida pronunciada de unión a activina A y activina B y una conservación prácticamente completa de la unión a GDF11 en comparación con los homólogos de ActRIIB-hFc que carecen de sustitución L79D. Obsérvese que el truncamiento solo (sin sustitución L79D) no alteró la selectividad entre los ligandos mostrados en este caso [compárese ActRIIB(L79 25-131)-hFc con ActRIIB(L79 20-134)-hFc].

10

Ejemplo 12. Generación de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc con secuencias de nucleótidos alternativas

15 Para generar ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, se fusionó de manera N-terminal el dominio extracelular de ActRIIB humano con una sustitución aspartato en la posición 79 nativa (SEQ ID NO: 1) y con truncamientos N-terminales y C-terminales (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1) con una secuencia líder de TPA en lugar del líder de ActRIIB nativo y de manera C-terminal con un dominio Fc humano mediante un ligador mínimo (tres residuos de glicina) (figura 5). En la figura 6 se muestra una secuencia de nucleótidos que codifica para esta proteína de fusión (SEQ ID NO: 27), y en la figura 9 se muestra una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica exactamente para la misma proteína de fusión (SEQ ID NO: 30). Se expresó y purificó esta proteína usando la metodología descrita en el ejemplo 1.

20

Ejemplo 13. Una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado aumenta la proliferación de progenitores eritroides en ratones

25 Se evaluó ActRIIB(L79D 25-131)-hFc para determinar su efecto sobre la proliferación de progenitores eritroides. Se trajeron ratones C57BL/6 macho (8 semanas de edad) con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.; n = 6) o vehículo (TBS; n = 6) los días 1 y 4, luego se sacrificaron el día 8 para la recogida de bazo, tibias, fémures y sangre. Se aislaron las células del bazo y de la médula ósea, se diluyeron en medio de Dulbecco modificado por Iscove que contenía suero bovino fetal al 5 %, se suspendieron en medio basado en metilcelulosa especializado, y se cultivaron durante 2 ó 12 días para evaluar los niveles de progenitores clonogénicos en las fases de unidad formadora de colonias eritroides (CFU-E) y unidad formadora de brotes eritroides (BFU-E), respectivamente. El medio basado en metilcelulosa para la determinación de BFU-E (MetoCult M3434, Stem Cell Technologies) incluía factor de células madre murino recombinante, interleucina 3 e interleucina 6, que no estaban presentes en el medio de metilcelulosa para la determinación de CFU-E (MetoCult M3334, Stem Cell Technologies), mientras que ambos medios contenían eritropoyetina, entre otros constituyentes. Tanto para BFU-E como para CFU-E, se determinó el número de colonias en placas de cultivo por duplicado derivadas cada muestra tisular, y el análisis estadístico de los resultados se basó en el número de ratones por grupo de tratamiento.

30

40 Los cultivos derivados de bazo de los ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc tenían el doble de colonias de CFU-E que los cultivos correspondientes de los ratones de control ($P < 0,05$), mientras que el número de colonias de BFU-E no difirió significativamente con el tratamiento *in vivo*. El número de colonias de CFU-E o BFU-E de los cultivos de médula ósea tampoco difirió significativamente con el tratamiento. Tal como se esperaba, números aumentados de colonias de CFU-E en los cultivos derivados de bazo estuvieron acompañados por cambios altamente significativos ($P < 0,001$) en el nivel de glóbulos rojos (aumento del 11,6 %), la concentración de hemoglobina (aumento del 12 %) y el nivel de hematocrito (aumento del 11,6 %) en el momento de sacrificio en ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc en comparación con los controles. Estos resultados indican que la administración *in vivo* de una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede estimular la proliferación de progenitores eritroides como parte de su efecto global para aumentar los niveles de glóbulos rojos.

45

Ejemplo 14. Una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado compensa la anemia inducida por quimioterapia en ratones

50 Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre los parámetros eritropoyéticos en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia basado en paclitaxel, que inhibe la división celular bloqueando la polimerización de microtúbulos. Se asignaron ratones C57BL/6 macho (8 semanas de edad) a uno de cuatro tratamientos:

- 1) paclitaxel (25 mg/kg, i.p.)
- 2) ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, i.p.)
- 5 3) paclitaxel + ActRIIB(L79D 25-131)-hFc
- 4) vehículo (TBS).

10 Se administró paclitaxel el día 0, mientras que se administró ActRIIB(L79D 25-131)-hFc o vehículo los días 0 y 3. Se extrajeron muestras de sangre para el análisis de CBC de cohortes independientes los días 1, 3 y 5, y se expresaron los resultados para los grupos de tratamiento 1-3 (anteriores) como diferencia en porcentaje con respecto al vehículo en un punto de tiempo dado. La atrición debida a la toxicidad del paclitaxel fue un problema en la cohorte de sólo paclitaxel el día 3 (donde n = 1); por lo demás, n = 3-5 por tratamiento por punto de tiempo. En comparación con el vehículo, paclitaxel solo disminuyó la concentración de hemoglobina prácticamente en un 13 % el día 5, mientras que la adición de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc previno esta disminución inducida por paclitaxel (figura 11). Se observaron efectos similares para los niveles de hematocrito y RBC. En ausencia de paclitaxel, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc aumentó la concentración de hemoglobina en un 10 % en comparación con el vehículo los días 3 y 5 (figura 11). Por tanto, una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede aumentar suficientemente los niveles de glóbulos rojos como para compensar la anemia inducida por quimioterapia.

20 Ejemplo 15. Una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado revierte la anemia inducida por nefrectomía en ratones

25 Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre la anemia en un modelo de ratón sometido a nefrectomía de enfermedad renal crónica. Se sometieron ratones C57BL/6 macho (11 semanas de edad) o bien a una operación simulada o bien a una nefrectomía unilateral para reducir la capacidad de producción de eritropoyetina. Se dejó a los ratones una semana para la recuperación posquirúrgica y luego se trajeron dos veces a la semana con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, i.p.; n = 15 por condición) o vehículo (TBS; n = 15 por condición) durante un total de 4 semanas. Se extrajeron muestras de sangre antes del inicio de la dosificación y después de 4 semanas de tratamiento. Mientras que los ratones sometidos a nefrectomía tratados con vehículo mostraron una disminución significativa del número de glóbulos rojos a lo largo del periodo de tratamiento de 4 semanas, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc no sólo previno la disminución, sino que aumentó los niveles de glóbulos rojos un 17 % ($P < 0,001$) por encima del nivel inicial (figura 12), a pesar de la capacidad renal reducida para la producción de eritropoyetina. En ratones sometidos a nefrectomía, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc 30 también generó aumentos significativos con respecto al nivel inicial en la concentración de hemoglobina y el nivel de hematocrito y, notablemente, estimuló cada uno de estos parámetros eritropoyéticos hasta aproximadamente el mismo grado en condiciones de nefrectomía que en condiciones de operación simulada (figura 13). Por tanto, una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede aumentar suficientemente los niveles de glóbulos rojos como para revertir la anemia en un modelo de enfermedad renal crónica.

40 Ejemplo 16. Una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado mejora la recuperación de la anemia inducida por pérdida de sangre en ratas

45 Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre los parámetros eritropoyéticos en un modelo de rata de anemia inducida por pérdida de sangre aguda (anemia poshemorrágica aguda). Ratas Sprague-Dawley macho (de aproximadamente 300 g) recibieron un catéter yugular crónico del proveedor (Harlan). El día -1, se extrajo el 20 % del volumen de sangre total de cada rata a lo largo de un periodo de 5 minutos a través del catéter bajo anestesia de isoflurano. El volumen de sangre extraída se basó en un valor para el volumen de sangre total calculado según la siguiente relación derivada por Lee *et al.* (J Nucl Med 25:72-76, 1985) para ratas con un peso corporal superior a 120 g:

$$\text{Volumen de sangre total (ml)} = 0,062 \times \text{peso corporal (g)} + 0,0012$$

55 Se reemplazó un mismo volumen de solución salina tamponada con fosfato a través del catéter en el momento de la extracción de sangre. Se trajeron las ratas con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.; n = 5) o vehículo (TBS; n = 5) los días 0 y 3. Se extrajeron muestras de sangre para el análisis de CBC a través del catéter los días -1 (nivel inicial), 0, 2, 4 y 6.

60 Las ratas de control respondieron a una pérdida de sangre del 20 % con una disminución de prácticamente el 15 % en los niveles de glóbulos rojos el día 0. Estos niveles permanecieron significativamente inferiores al nivel inicial los días 2 y 4, y no se habían recuperado totalmente el día 6 (figura 14). Aunque las ratas tratadas con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc mostraron una disminución prácticamente idéntica en los niveles de glóbulos rojos después de una pérdida de sangre del 20 %, estas ratas mostraron luego una completa recuperación en tales niveles el día 2, seguido de una elevación adicional los días 4 y 6, lo que representa una mejora altamente significativa con respecto a los niveles de control en los puntos de tiempo correspondientes (figura 14). Se obtuvieron resultados similares 65 para la concentración de hemoglobina. Estos hallazgos demuestran que una trampa de GDF con dominio

extracelular de ActRIIB truncado puede producir una recuperación más rápida de los niveles de glóbulos rojos de la anemia provocada por hemorragia aguda.

5 Ejemplo 17. Una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado aumenta los niveles de glóbulos rojos en primates no humanos

Se evaluaron dos trampas de GDF, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, para determinar su capacidad para estimular la producción de glóbulos rojos en macaco cangrejero. Se trataron los macacos por vía subcutánea con trampa de GDF (10 mg/kg; n = 4 machos/4 hembras) o vehículo (n = 2 machos/2 hembras) los días 10 1 y 8. Se extrajeron muestras de sangre los días 1 (nivel inicial de pretratamiento), 3, 8, 15, 29 y 44, y se analizaron para determinar los niveles de glóbulos rojos (figura 15), el hematocrito (figura 16), los niveles de hemoglobina (figura 17) y los niveles de reticulocitos (figura 18). Los macacos tratados con vehículo mostraron niveles disminuidos de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina en todos los puntos de tiempo posteriores al tratamiento, un efecto esperado del muestreo repetido de sangre. En cambio, el tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc o 15 ActRIIB(L79D 25-131)-hFc aumentó estos parámetros en el primer punto de tiempo posterior al tratamiento (día 3) y los mantuvo en niveles sustancialmente elevados durante la duración del estudio (figuras 15-17). De manera importante, los niveles de reticulocitos en macacos tratados con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc se aumentaron sustancialmente los días 8, 15 y 29 en comparación con el vehículo (figura 18). Este resultado demuestra que el tratamiento con trampa de GDF aumentó la producción de precursores de glóbulos rojos, dando 20 como resultado niveles elevados de glóbulos rojos.

En conjunto, estos datos demuestran que las trampas de GDF truncadas, así como las variantes de longitud completa, pueden usarse como antagonistas selectivos de GDF11 y ligandos posiblemente relacionados para aumentar la formación de glóbulos rojos *in vivo*.

25 Ejemplo 18. Trampa de GDF derivada de ActRIIB5

Otros han notificado una forma soluble alternativa de ActRIIB (designada como ActRIIB5), en la que el exón 4, que incluye el dominio transmembrana de ActRIIB, se ha reemplazado por una secuencia C-terminal diferente 30 (documento WO2007/053775).

La secuencia de ActRIIB5 humano nativo sin su líder es tal como sigue:

```
GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWIDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGAHE
```

(SEQ ID NO: 36)

35 Pueden realizarse una sustitución de leucina a aspartato, u otras sustituciones ácidas, en la posición 79 nativa (subrayada y resaltada) tal como se describe para construir la variante ActRIIB5(L79D), que tiene la siguiente secuencia:

```
GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGAHTGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
```

(SEQ ID NO: 37)

40 Esta variante puede conectarse a Fc humano con un ligador TGGG para generar una proteína de fusión ActRIIB5(L79D) humano-hFc con la siguiente secuencia:

```
GRGEAETRECIYYNANWELRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGAHTGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)
```

Este constructo puede expresarse en células CHO.

Ejemplo 19. Efectos en ratones del tratamiento combinado con EPO y una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado

- La EPO induce la formación de glóbulos rojos aumentando la proliferación de precursores eritroides, mientras que las trampas de GDF posiblemente podrían afectar a la formación de glóbulos rojos de maneras que complementen o potencien los efectos de la EPO. Por tanto, los solicitantes investigaron el efecto del tratamiento combinado con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre los parámetros eritropoyéticos. A ratones C57BL/6 macho (9 semanas de edad) se les administró una única inyección i.p. de EPO humana recombinante sola (epoetina alfa, 1800 unidades/kg), ActRIIB(L79D 25-131)-hFc solo (10 mg/kg), tanto EPO como ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, o vehículo (solución salina tamponada con Tris). Se sacrificaron los ratones 72 h después de la dosificación para la recogida de sangre, bazo y fémures.
- Se procesaron los bazo y fémures para obtener células precursoras eritroides para el análisis por citometría de flujo. Después de la retirada, se trituró el bazo en medio de Dulbecco modificado por Iscove que contenía suero bovino fetal al 5 % y se disoció mecánicamente empujándolo a través de un filtro celular de 70 µm con el émbolo de una jeringa estéril de 1 ml. Se limpian los fémures de cualquier tejido conjuntivo o músculo residual y se recortaron los extremos para permitir la recogida de médula lavando la diáfisis restante con medio de Dulbecco modificado por Iscove que contenía suero bovino fetal al 5 % a través de una aguja de calibre 21 conectada a una jeringa de 3 ml. Se centrifugaron las suspensiones celulares (2000 rpm durante 10 min) y se resuspendieron los sedimentos celulares en PBS que contenía suero bovino fetal al 5 %. Se incubaron las células (10^6) de cada tejido con anticuerpo anti-IgG de ratón para bloquear la unión inespecífica, luego se incubaron con anticuerpos marcados de manera fluorescente contra los marcadores de superficie celular de ratón CD71 (receptor de transferrina) y Ter119 (un antígeno asociado con la glicoforina A de superficie celular), se lavaron, y se analizaron mediante citometría de flujo. Se excluyeron del análisis las células muertas en las muestras mediante contratinación con yoduro de propidio. Se evaluó la diferenciación eritroide en bazo o médula ósea mediante el grado de marcaje de CD71, que disminuye a lo largo del transcurso de la diferenciación, y marcaje de Ter119, que aumenta durante la diferenciación eritroide terminal que comienza con la fase de proeritroblasto (Socolovsky *et al.*, 2001, Blood 98:3261-3273; Ying *et al.*, 2006, Blood 108:123-133). Por tanto, se usó citometría de flujo para determinar el número de proeritroblastos ($CD71^{\text{alto}}Ter119^{\text{bajo}}$), eritroblastos basófilos ($CD71^{\text{alto}}Ter119^{\text{alto}}$), eritroblastos policromatófilos + ortocromatófilos ($CD71^{\text{med}}Ter119^{\text{alto}}$), y eritroblastos ortocromatófilos tardíos + reticulocitos ($CD71^{\text{bajo}}Ter119^{\text{alto}}$), tal como se describe.
- El tratamiento combinado con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc condujo a un aumento sorprendentemente vigoroso de los glóbulos rojos. En el periodo de tiempo de 72 h de este experimento, ni EPO ni ActRIIB(L79D 25-131)-hFc solos aumentaron significativamente el hematocrito en comparación con el vehículo, mientras que el tratamiento combinado con los dos agentes condujo a un aumento de prácticamente el 25 % en el hematocrito que fue inesperadamente sinérgico, es decir, mayor que la suma de sus efectos independientes (figura 19). En general, se considera que una sinergia de este tipo es una evidencia de que los agentes individuales están actuando a través de mecanismos celulares diferentes. También se observaron resultados similares para las concentraciones de hemoglobina (figura 20) y las concentraciones de glóbulos rojos (figura 21), cada una de las cuales también aumentó de manera sinérgica mediante el tratamiento combinado.
- El análisis de los niveles de precursores eritroides reveló un patrón más complejo. En el ratón, se considera que el bazo es el principal órgano responsable de la eritropoyesis inducible ("estrés"). El análisis por citometría de flujo del tejido esplénico a las 72 h reveló que la EPO alteró considerablemente el perfil de precursores eritropoyéticos en comparación con el vehículo, aumentando el número de eritroblastos basófilos en más del 170 % a expensas de los precursores tardíos (eritroblastos ortocromatófilos tardíos + reticulocitos), que disminuyeron en más de un tercio (figura 22). De manera importante, el tratamiento combinado aumentó significativamente los eritroblastos basófilos en comparación con el vehículo, pero en menor medida que la EPO sola, mientras que respaldaba una maduración no disminuida de precursores en etapa tardía (figura 22). Por tanto, el tratamiento combinado con EPO y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc aumentó la eritropoyesis a través de una potenciación equilibrada de proliferación y maduración de precursores. A diferencia del bazo, el perfil de células precursoras en médula ósea después del tratamiento combinado no difirió apreciablemente del de después de EPO sola. A partir del perfil de precursores esplénicos, los solicitantes predicen que el tratamiento combinado conduciría a niveles aumentados de reticulocitos y estaría acompañado de una elevación sostenida de los niveles de glóbulos rojos maduros, si el experimento se extendiese más allá de las 72 h.
- En conjunto, estos hallazgos demuestran que una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado puede administrarse en combinación con EPO para aumentar sinérgicamente la formación de glóbulos rojos *in vivo*. Actuando a través de un mecanismo complementario pero indefinido, una trampa de GDF puede moderar el fuerte efecto proliferativo de un activador del receptor de EPO solo y todavía permitir que se logran niveles diana de glóbulos rojos con menores dosis de un activador del receptor de EPO, evitando de ese modo los posibles efectos adversos u otros problemas asociados con mayores niveles de activación del receptor de EPO.

Ejemplo 20. Una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado aumenta los niveles de RBC en un modelo de ratón de síndrome mielodisplásico

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son diversos trastornos de insuficiencia de médula ósea caracterizados clínicamente por citopenia periférica, anemia resistente y riesgo de progresión a leucemia mieloide aguda. La transfusión de RBC es una terapia de mantenimiento clave en el SMD para aliviar la fatiga, mejorar la calidad de vida y prolongar la supervivencia; sin embargo, las transfusiones regulares normalmente dan como resultado hemocromatosis en estos pacientes, con efectos adversos sobre la morbilidad que pueden conducir al uso de remedios tales como terapia de quelación de hierro (Dreyfus, 2008, Blood Rev 22 suppl. 2:S29-34; Jabbour *et al.*, 2009, Oncologist 14:489-496). Aunque la eritropoyetina (EPO) recombinante y sus derivados son un enfoque terapéutico alternativo en un pequeño porcentaje de pacientes con SMD (Estey, 2003, Curr Opin Hematol 10:60-67), estudios recientes sugieren que esta clase de agentes está asociada con un riesgo aumentado de morbilidad a algunas dosis debido a acontecimientos tromboembólicos y crecimiento tumoral (Krapf *et al.*, 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4:470-480; Glaspy, 2009, Annu Rev Med 60:181-192). Por tanto, existe la necesidad de una terapia contra SMD alternativa que aumente los niveles de RBC sin la hemocromatosis que acompaña a las transfusiones prolongadas o los riesgos inherentes en la EPO exógena y sus derivados.

Por tanto, los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre los niveles de RBC en un modelo de ratón transgénico que recapitula las características clave del SMD, incluyendo la transformación en leucemia aguda (Lin *et al.*, 2005, Blood 106:287-295; Beachy *et al.*, 2010, Hematol Oncol Clin North Am 24:361-375). Comenzando a los tres meses de edad, se trajeron ratones NUP98-HOXD13 macho y hembra dos veces a la semana con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.) o vehículo (TBS). Se dosificaron compañeros de camada de tipo natural con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc o vehículo y sirvieron como controles. Se extrajeron muestras de sangre antes del inicio de la dosificación y a intervalos mensuales después de eso para realizar mediciones de CBC.

Se observaron varias diferencias en el nivel inicial entre ratones NUP98-HOXD 13 y controles de tipo natural. Específicamente, los ratones NUP98-HOXD13 macho mostraron concentraciones de RBC significativamente disminuidas (-8,8 %, p < 0,05) y hematocrito (-8,4 %, p < 0,05) en comparación con ratones de tipo natural, y los ratones NUP98-HOXD13 hembra mostraron tendencias similares. En la siguiente tabla se muestran los resultados después de tres meses de dosificación (media ± DE).

Ratones NUP98-HOXD13		Conc. de RBC (10 ¹² células/l)	Conc. de hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)
Macho	Vehículo (n = 6)	6,56 ± 0,51	10,68 ± 0,68	31,83 ± 2,13
	ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (n = 8)	8,65 ± 0,54 ***	13,54 ± 0,91 ***	39,20 ± 2,82 ***
Hembra	Vehículo (n = 5)	6,38 ± 1,61	10,30 ± 2,58	31,96 ± 8,73
	ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (n = 6)	8,52 ± 0,70 *	13,52 ± 0,56 *	42,23 ± 2,53 †

*** p < 0,001 frente a macho + vehículo
* p < 0,05 frente a hembra + vehículo
† p = 0,056 frente a hembra + vehículo

En comparación con el vehículo, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc durante tres meses aumentó significativamente las concentraciones de RBC y las concentraciones de hemoglobina (en aproximadamente un 30 %) en ratones NUP98-HOXD13 tanto macho como hembra. El hematocrito también aumentó significativamente en estos ratones macho y aumentó con una tendencia hacia significación en los ratones hembra. Por tanto, una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede aumentar significativamente los niveles de RBC en un modelo murino de SMD. Mientras que las transfusiones son inherentemente una fuente de hierro exógeno, una trampa de GDF aumenta los niveles de RBC fomentando el uso de las reservas de hierro endógeno mediante eritropoyesis, evitando de ese modo la hemocromatosis y sus consecuencias negativas. Además, tal como se observa en el ejemplo 19, una trampa de GDF actúa a través de un mecanismo celular diferente (aunque complementario) que el usado por los activadores del receptor de EPO para estimular la eritropoyesis, y evita de ese modo los posibles efectos adversos asociados con la activación del receptor de EPO.

Ejemplo 21. Efecto de una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado sobre los niveles de RBC y la morfología en un modelo de ratón de β-talasemia

En síndromes de talasemia, que representan las causas más comunes de eritropoyesis ineficaz, los desequilibrios en la expresión de cadenas de α-globina y β-globina dan como resultado anemia debido a una apoptosis aumentada durante la maduración de eritroblastos. La transfusión de RBC es actualmente una terapia de mantenimiento clave en la talasemia, pero a lo largo del tiempo posiblemente provoca una acumulación de hierro mortal en determinados tejidos (Tanno *et al.*, 2010, Adv Hematol 2010:358283). Por ejemplo, la enfermedad cardiaca asociada con hemocromatosis puede representar el 50 % de la mortalidad en pacientes con talasemia mayor (Borgna-Pignatti *et*

al., 2005, Ann NY Acad Sci 1054:40-47). De manera importante, los niveles de EPO endógena son normalmente elevados y contribuyen a la etiología de la enfermedad en los síndromes de talasemia, así como en otros trastornos de eritropoyesis ineficaz; por tanto, el uso terapéutico de EPO recombinante puede ser inapropiado. Por tanto, existe la necesidad de terapias alternativas para la talasemia y otros trastornos de eritropoyesis ineficaz que aumenten los niveles de RBC sin la hemocromatosis que acompaña a las transfusiones prolongadas.

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-mFc sobre la formación de RBC en un modelo de ratón de β-talasemia intermedia en el que se ha delecionado toda la región codificante del gen codificante de β-globina principal. Los ratones homocigóticos para este alelo *Hbb^{d3th}* muestran una anemia microcítica hipocrómica con cuerpos de inclusión en una alta proporción de RBC circulantes (Skow *et al.*, 1983, Cell 1043:1043-1052). En un experimento preliminar, se asignaron aleatoriamente ratones β-talasémicos *Hbb^{-/-}* (C57BL/6J-*Hbb^{d3th/J}*) a los 2-5 meses de edad para recibir ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (10 mg/kg) o vehículo (solución salina tamponada con Tris) mediante inyección subcutánea dos veces a la semana. Compañeros de camada de tipo natural a los que se les dosificó vehículo sirvieron como controles adicionales. Se extrajeron muestras de sangre (100 µl) mediante punción cigomática antes del inicio de la dosificación y a intervalos regulares después de eso para el análisis de CBC. La caracterización de los parámetros hematológicos en el nivel inicial confirmó que los ratones β-talasémicos *Hbb^{-/-}* eran gravemente anémicos (figura 23), y el tratamiento de ratones *Hbb^{-/-}* con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 4 semanas aumentó considerablemente el número de RBC en comparación con los ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo, reduciendo de ese modo la anemia observada en este modelo a la mitad (figura 24). También se observaron aumentos asociados al tratamiento del hematocrito y la concentración de hemoglobina. De manera importante, el tratamiento de ratones *Hbb^{-/-}* con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc también dio como resultado una morfología de RBC mejorada y una hemólisis y un residuo eritrocítico reducidos en comparación con los ratones *Hbb^{-/-}* tratados con vehículo (figura 25), indicando así una mejora fundamental en la eritropoyesis. Por tanto, un polipéptido trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede proporcionar un beneficio terapéutico para la anemia en un modelo murino de β-talasemia aumentando tanto el número como la morfología de RBC. Al fomentar la maduración de eritroblastos mientras se reduce la anemia, los polipéptidos trampa de GDF pueden tratar la eritropoyesis ineficaz. A diferencia de las transfusiones, que son inherentemente una fuente de hierro exógeno, un polipéptido trampa de GDF puede aumentar los niveles de RBC fomentando el uso de las reservas de hierro endógeno mediante eritropoyesis, evitando de ese modo la hemocromatosis y sus consecuencias negativas.

Ejemplo 22. Efecto de una trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado sobre los niveles de EPO, la esplenomegalia, la densidad ósea y la hemocromatosis en un modelo de ratón de β-talasemia

La hipoxia asociada con la eritropoyesis ineficaz provoca niveles elevados de EPO que pueden impulsar una expansión masiva de eritroblastos tanto dentro como fuera de la médula ósea, conduciendo a esplenomegalia (agrandamiento del bazo), patología ósea inducida por eritroblastos y hemocromatosis tisular, incluso en ausencia de transfusiones de RBC terapéuticas. La hemocromatosis sin tratar conduce a deposición de hierro tisular, disfunción multiorgánica y mortalidad prematura (Borgna-Pignatti *et al.*, 2005, Ann NY Acad Sci 1054:40-47; Borgna-Pignatti *et al.*, 2011, Expert Rev Hematol 4:353-366), lo más frecuentemente debido a miocardiopatía en formas graves de talasemia (Lekawannijit *et al.*, 2009, Can J Cardiol 25:213-218). Al aumentar la eficacia eritropoyética, un polipéptido trampa de GDF puede aliviar no sólo la anemia subyacente y los niveles elevados de EPO, sino también las complicaciones asociadas de esplenomegalia, patología ósea y hemocromatosis.

Los solicitantes investigaron los efectos de un polipéptido trampa de GDF sobre estos parámetros en el mismo modelo de ratón de β-talasemia intermedia estudiado en el ejemplo 21. Se asignaron aleatoriamente ratones β-talasémicos *Hbb^{-/-}* (C57BL/6J-*Hbb^{d3th/J}*) a los 3 meses de edad para recibir ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (1 mg/kg, n = 7) o vehículo (solución salina tamponada con Tris, n = 7) mediante inyección subcutánea dos veces a la semana durante 2 meses. Compañeros de camada de tipo natural a los que se les dosificó vehículo (n = 13) sirvieron como controles adicionales. Se extrajeron muestras de sangre (100 µl) en el momento de terminación del estudio para el análisis de CBC. Al terminar el estudio, se determinó la densidad mineral ósea mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA), se determinaron los niveles de EPO sérica mediante ELISA, se cuantificaron las especies reactivas del oxígeno (ROS) con diacetato de 2',7'-dicitrodihidrofluoresceína y citometría de flujo (Suragani *et al.*, 2012, Blood 119:5276-5284), y se determinaron los niveles de ARNm de hepcidina mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

Este polipéptido trampa de GDF ejerció múltiples efectos hematológicos compatibles con el alivio de la eritropoyesis ineficaz. El tratamiento de ratones *Hbb^{-/-}* con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 2 meses aumentó los recuentos de RBC en un 25 % en comparación con los ratones *Hbb^{-/-}* a los que se les dosificó vehículo (figura 26). En ratones *Hbb^{-/-}*, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc también aumentó significativamente la concentración de hemoglobina y el hematocrito a los 2 meses en comparación con los controles de vehículo. Estos cambios estuvieron acompañados de niveles reducidos de reticulocitos circulantes ($31,3 \pm 2,3\%$ frente a $44,8 \pm 5,0\%$ para ratones *Hbb^{-/-}* tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc o vehículo, respectivamente), que es compatible con el alivio de la anemia. Al igual que en el ejemplo 21, el tratamiento de ratones *Hbb^{-/-}* con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc dio como resultado una morfología de RBC mejorada y un residuo eritrocítico reducido en comparación con los ratones

Hbb^{-/-} a los que se les dosificó vehículo. En comparación con los individuos sanos, los pacientes con talasemia muestran una tasa aumentada de destrucción de RBC y niveles elevados de bilirrubina sérica, que es un producto de catabolismo de hemo y marcador de hemólisis (Orten, 1971, Ann Clin Lab Sci 1:113-124). En ratones *Hbb^{-/-}*, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo los niveles de bilirrubina sérica a los 2 meses a prácticamente la mitad en comparación con el vehículo (figura 27), proporcionando de ese modo evidencias de que ActRIIB(L79D 25-131)-mFc puede mejorar inesperadamente la integridad estructural/funcional de los RBC maduros ya que fomenta la formación de RBC. De manera importante, el tratamiento de ratones *Hbb^{-/-}* con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc redujo los niveles de EPO sérica a los 2 meses en más de un 60 % en comparación con el vehículo en el mismo modelo (figura 28). Puesto que los niveles elevados de EPO son un sello distintivo de la eritropoyesis ineficaz en β-talasemia, la reducción de tales niveles en este caso es una fuerte evidencia de que ActRIIB(L79D 25-131)-mFc alivia la propia eritropoyesis ineficaz, no sólo la anemia que la provoca, en este modelo murino de talasemia.

Este polipéptido trampa de GDF también produjo cambios beneficiosos en los criterios de valoración que representan las principales complicaciones de la eritropoyesis ineficaz. En pacientes con talasemia, tanto la esplenomegalia como el deterioro óseo están provocados por eritropoyesis extramedular e hiperplasia eritroide estimulada por EPO. En ratones *Hbb^{-/-}*, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 2 meses redujo significativamente el peso del bazo en comparación con el vehículo (figura 29) y restableció completamente la densidad mineral ósea a los valores de tipo natural (figura 30). La homeostasis de hierro también se mejoró significativamente mediante el tratamiento con este polipéptido trampa de GDF. El hierro sérico consiste tanto en hierro no unido (libre) como en hierro unido a apotransferrina (que forma transferrina), una proteína especializada para transportar hierro elemental en la circulación. El hierro sérico constituye un componente relativamente pequeño y lábil de hierro corporal total, mientras que los niveles séricos de ferritina, otra forma de almacenamiento de hierro hallada principalmente de manera intracelular, representan un componente más grande y menos lábil. Una tercera medida de la carga de hierro es la saturación de transferrina, el grado al que se ocupa la capacidad de unión a hierro de la transferrina. En ratones *Hbb^{-/-}*, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc durante 2 meses redujo significativamente cada uno de estos indicadores de hemocromatosis en comparación con el vehículo (figura 31). Además de estos efectos sobre estos diversos parámetros de homeostasis de hierro, ActRIIB(L79D 25-131)-mFc normalizó la hemocromatosis tisular en ratones *Hbb^{-/-}* tal como se determina mediante análisis histoquímico en bazo, hígado y riñón (figura 32). Además, este polipéptido trampa de GDF ejerció un efecto beneficioso sobre la expresión de hepcidina, una proteína hepática considerada como regulador maestro de la homeostasis de hierro (Gantz, 2011, Blood 117:4425-4433), cuyos niveles varían inversamente con la asimilación de hierro alimentario. El tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc revirtió la expresión anómalamente baja de hepcidina en el hígado de ratones *Hbb^{-/-}* (figura 33). Finalmente, se realizó otro estudio con diseño similar para determinar el efecto de esta trampa de GDF sobre las especies reactivas del oxígeno (ROS), que se piensa que median muchos de los efectos tóxicos de la hemocromatosis (Rund *et al.*, 2005, N Engl J Med 353:1135-1146). En ratones *Hbb^{-/-}* de 3 meses de edad, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-mFc a 1 mg/kg dos veces a la semana durante 2 meses normalizó prácticamente los niveles de ROS (figura 34) y, por tanto, se predría que reduce en gran medida el daño tisular mediado por ROS en talasemia y otras enfermedades caracterizadas por eritropoyesis ineficaz.

En conjunto, los hallazgos anteriores demuestran que los polipéptidos trampa de GDF pueden tratar la eritropoyesis ineficaz, incluyendo la anemia y los niveles elevados de EPO, así como complicaciones tales como esplenomegalia, patología ósea inducida por eritroblastos y hemocromatosis, y sus patologías acompañantes. Con esplenomegalia, tales patologías incluyen dolor torácico o abdominal e hiperplasia reticulocendotelial. La hematopoyesis extramedular puede producirse no sólo en el bazo, sino posiblemente en otros tejidos en forma de pseudotumores hematopoyéticos extramedulares (Musallam *et al.*, 2012, Cold Spring Harb Perspect Med 2:a013482). Con patología ósea inducida por eritroblastos, las patologías acompañantes incluyen densidad mineral ósea baja, osteoporosis, y dolor óseo (Haidar *et al.*, 2011, Bone 48:425-432). Con hemocromatosis, las patologías acompañantes incluyen supresión de hepcidina e hiperabsorción de hierro alimentario (Musallam *et al.*, 2012, Blood Rev 26 (supl. 1):S16-S19), múltiples endocrinopatías y fibrosis/cirrosis hepática (Galanello *et al.*, 2010, Orphanet J Rare Dis 5:11), y miocardiopatía por hemocromatosis (Lekawantijit *et al.*, 2009, Can J Cardiol 25:213-218). A diferencia de las terapias existentes para la eritropoyesis ineficaz, los polipéptidos trampa de GDF tales como ActRIIB(L79D 25-131)-mFc son capaces de reducir la hemocromatosis en modelos murinos mientras que, simultáneamente, aumentan los niveles de RBC. Esta novedosa capacidad distingue a los polipéptidos trampa de GDF de las transfusiones de sangre, que cargan inherentemente al cuerpo con hierro exógeno en el transcurso del tratamiento de la anemia y lo hacen sin aliviar la afección subyacente de eritropoyesis ineficaz.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido para su uso en el tratamiento de eritropoyesis ineficaz en un paciente con talasemia, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido es capaz de unirse a GDF8 y/o GDF11.
- 5 2. Polipéptido para su uso según la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1.
- 10 3. Polipéptido para su uso según la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1.
- 15 4. Polipéptido para su uso según la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1, pero en donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1.
- 20 5. Polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1.
- 25 6. Polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1.
- 30 7. Polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1, pero en donde el polipéptido comprende un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1.
8. Polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polipéptido es una proteína de fusión que comprende un polipéptido de ActRIIB y un dominio Fc de inmunoglobulina.
- 35 9. Polipéptido para su uso según la reivindicación 8, en donde la proteína de fusión comprende además un ligador no estructurado posicionado entre el dominio Fc y el polipéptido de ActRIIB.
10. Polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 40 100 % idéntica a SEQ ID NO: 28.
11. Polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.
- 45 12. Polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el aminoácido ácido es ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E).
13. Polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el paciente tiene esplenomegalia.
- 50 14. Polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el paciente tiene hemocromatosis.

ActRIIa ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS
ActRIIb CRGEAEETREC IIVYMANWELE RTNOSGLENC EGEODDKRLHC TAKWKRNSSGT

IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM
IELVKKGWL DDFNICYDROE CVRKEENPQV YFCCCEGNFC MERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKEPT
GGPEVTVYEPP PTAPT

Fig. 1

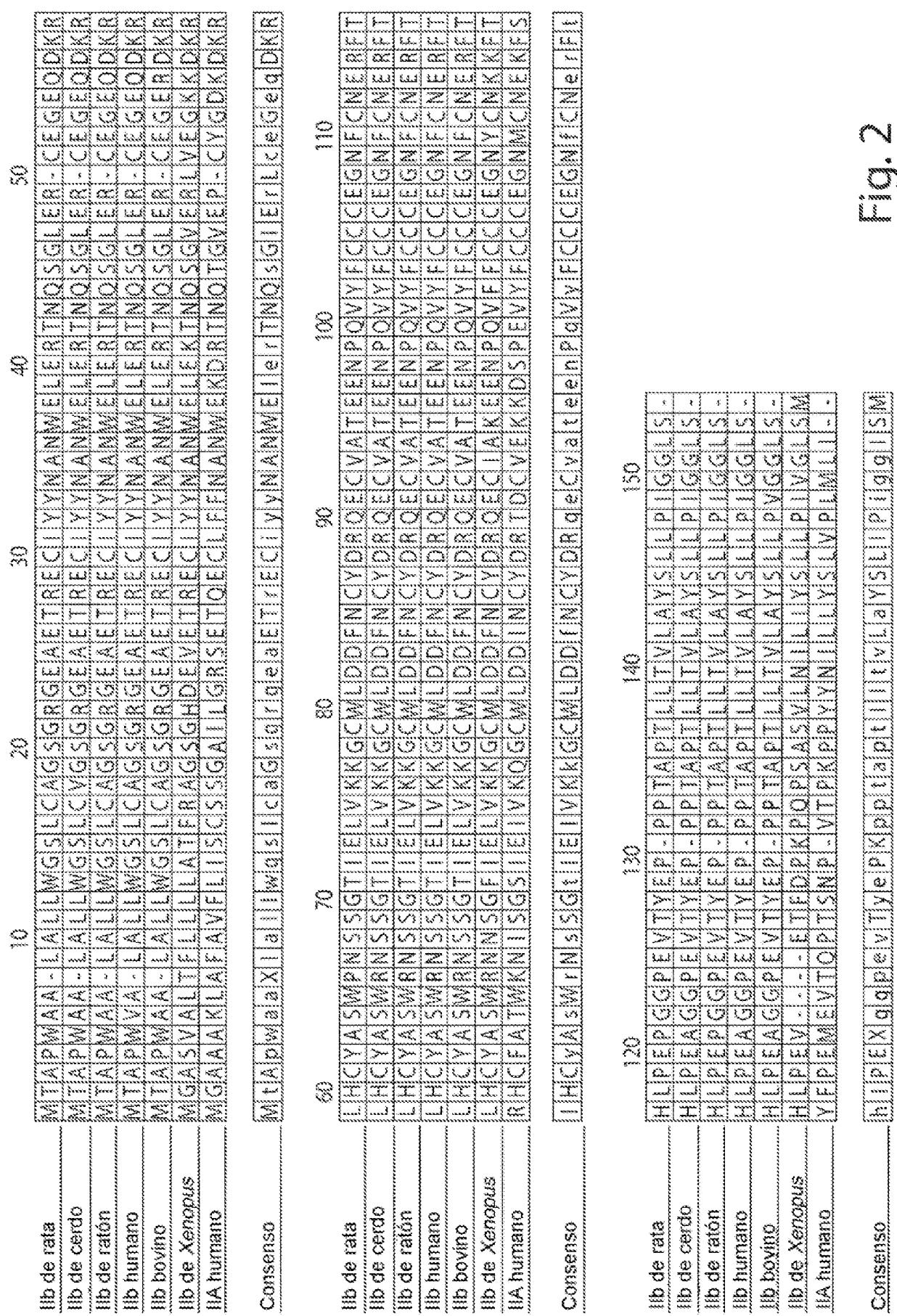


Fig. 2

Hipoxiogenase Type I and II apoproteins of *Xenopus laevis* and *lumbricus*

Consenso

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWDDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPPKPD TLMISRTPEV TCVVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDLIAV
301 EWESNGQFEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALEHNHYTQK SLSLSPGK

Fig. 3

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG CCTCTGCTGT GTGCTGCCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGGCT GAGACACGGG
TCAGAAGCAA ACCGGGCCCGC GGAGACCCCGC ACCCCCTCGA CTCTCTGCCTC

101 AGTGCATCTA CTACAACCCC AACCTGGGACC TGGAGCCAC CAACCAGAGC
TCACGTAGAT GATGTTGCCTG TTGACCCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG

151 GGCCTGGAGC GCTGCCAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
CCGGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCCCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG

201 CTCCCTGGCCG AACAGCTCTG GCACCATCGA CCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
GAGGACCGCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACCGA

251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC

301 GAGAACCCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
CTCTTGGGGG TCCACATCGA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT

351 GCGCTTCACT CATTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGGAGC
CGCGAACTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG

401 CACCCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCACG

451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA
GGTCGTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCACT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGAC CCCTGAGGTC ACATGCCGTGG
TGGGTTCCCTG TGGGACTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCCACC

551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAACTT GACCATGCCAC

601 GACGGCCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGGGGG AGGACCACTA
CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCCT CACCGTCCCTG CACCAGGACT
GTTGTCGTGC ATGCCACACC AGTCCGAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCCTGA

Fig. 4

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCC
 CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGGTTGTT TCGGGAGGGT

 751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAAC
 CGGGGCTAGC TCTTTGCTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTICG

 801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAAGG
 TGTCCACATG TGGAACGGGG CTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC

 851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 AGTCGGACTG GACGGACCCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC

 901 GAGTGGGAGA GCAATGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGGCTCC
 CTCACCCCTCT CGTTACCCGT CGGGCTCTTG TTGATGTTCT GGTGGGGAGG

 951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAAGCAAG CTCACCGTGG
 GCACGACCTG AGGCTGCCGA CGAAGAACGA CATATCGTTC GAGTGGCACC

 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCCAT
 TCTTCTCGTC CACCGTCGTC CCCTTGCAGA AGAGTACCGAC GCACTACGTA

 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACCA CACGCAGAAG ACCCTCTCCC TGTCCCCCCC
 CTCCGAGACG TGTTGGTGT CTGGCTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGGCC

 1101 TAAATGA (SEQ ID NO:25)
 ATTTACT (SEQ ID NO:33)

Fig. 4 (cont.)

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC
51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKG[CWD] DDFNCYDROE CVATEENPQV
101 YFCCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFPYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTPPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26)

Fig. 5

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACCGACA CACGACCGACG ACACACCTCG

51 E T R E C I Y Y
51 AGTCUTTCGTT TCGCCCCGCCG CCCGCTGAGAC ACCGGGAGTGC ATCTACTACA
TCAGAACCAA AGCGGGGCCGC CGCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 ACGCCAATG CGAGCTGCAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
TGCGGTTGAC CCTCGACCTC CGGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151 GAAGCCGAGC AGGACAAACCG CCTGGCACTGC TACGCCCTCCG GGGCCAACAG
CTTCCGCTCG TCCTGTTGG CGACGTGACG ATGGGGAGGA CGCGTTGTC

201 S G T I E L V K K G C W D D D F
201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAACGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA
GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCCCTG CTACTGAAGT

251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGCTG
TGACGATGCT ATCCGTCCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTGGGA AGTGAGTAAA

351 P E A G G P E V T Y E P P P T
351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCCACACGGTG
CGGTCTCCGA CCCCCGGGGC TTCAGTGCAT GCTCGCTGGG GGCTGTCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCA CGTGGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGGA
CACCTTGACT GTGTACGGGT CGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAACGG GGGTTTGCG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACACAT CGGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
GGCCTGGGA CTCCAGTGTGTA CGCACCAACCA CCTCCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG CGGTGGAGGT GCATAATGCC
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

Fig. 6

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

 701 GCAACGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCCCC GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

 751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCAACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
 TTTCGGTTTC CGTCGGGGC TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGGTAG

 801 CCCGGAGGAG ATGACCAAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
 GCCCCCTCCTC TACTGGTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC CCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
 CGAAGATAAGG CTGGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

 901 GAGAACAACT ACAAGACCCAC CCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

 951 CPTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
 GAAGGAGATA TCGTTCGACT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCCT

 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
 TGCAGAACAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

 1051 CAGAACAGCC TCTCCCTGTC CCCGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 27)
 CTCTTCTCCG AGACGGACAG GGGCCCCATT ACT (SEQ ID NO: 34)

Fig. 6 (cont.)

1 **E**FRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCW**D**DDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
151 VVDVSHEDEPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLR PSREEMTKNQ
251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPPVLDSDG SFFLYSKLTV
301 DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 28)

Fig. 7

1 **E**FRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCW**D**DDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPT (SEQ ID NO: 29)

Fig. 8

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACCGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 E T R E C I V Y
AGTCTTCGTT TCGCCCCGGCG CGGCCGAAAC CGGGGAAAGGT AATTAAATACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCCCGC GGCGGCTTTCG GGCGCTTACA TAAATAATGT

101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
ATGCTTAATTCG GGAACTCGAA CGGACCGAAC ACCATCGGGCT CGAACCGCGT
TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

151 E G S Q D K R L H C Y A S W R N S
GAGCGGGAAAC ACCGATAAAACG CCTCCATTGCG TATCCGTCGT GGAGGAAACTC
CTCCCCCTTCG TCCTATTGCG CGAGGTAACG ATACGCCAGCA CCTCCCTTCGAG

201 S G T I E L V X K G C W D D D F
CTGGGGGACG ATGAAACTGG TCAAGAAACG GTGCTGGGAC GACGATTTCA
GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTCC CACGACCCCTG CTGCTAAAGT

251 N C Y D R Q E C V A T S E N P Q V
ATGCTTAATCA CGGCCAGCAA TGTGTGGGA CGGAACGAGAA CGGGCACCTC
TAACAAACT GGGGGTCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGGGTCCAG

301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
TATTTCTGTT GTGGGGAGGG GAATTTCTGT AATGAAACGAT TTACCCACCT
ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTGCCA AATGGGTGGA

351 P E A G G P E V T Y E P P P F T
CGCGGAAAGCG CGGGGGGCGCG AGGTGACGTA TGAACCCCGCG CGAACCGCTG
GGGGCTTCGG CCCGGGGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGGC GGGTGGCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CGTGCCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT CGGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACG
GGCCTGGGGA CTCCAGTGTGTA CGCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG CGGTGGAGGT GCATAATGCC
GACTCCACTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

Fig. 9

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGCACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTPGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTP TTGGTAGAGG

 751 AAAGCCAAG GGCAGCCCCG AGAACACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGCTGTC CACATGTGGG ACCGGGGTAG

 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
 GGCCCTCCTC TACTGGTCTC TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC CCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
 CGAAGATAAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

 901 GAGAACAACT ACAAGACACAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

 951 CTPCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCC

 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
 TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

 1051 CAGAACAGGCC TCTCCCTGTC CCCGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 30)
 GTCFTCTCGG AGACGGACAG GGGCCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 35)

Fig. 9 (cont.)

GAAAC CCGCGAATGT ATTATTACA ATGCTAATTG GGAACTOGAA
CCGACGAACC AATCCGGCT CGAACGGTGT GAGGCCGAAC AGGATAAACG
CCTCCATTGC TATGCCGTGCT GCACCGAACTC CTCCCCGACCG ATTGAACTOG
TCAAGAAGG GTGCTGGGAC GACGGATTTCA ATTGTATGAA CCCCCAGGAA
TGTGTCGGCA CCGAAGAGAA TCCGCACGTC TATTTCTGTT GPTGCCAGGG
GAATTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCCGAAGCC GGCGGGCCCC
AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCAC (SEQ ID NO: 31)

Fig. 10

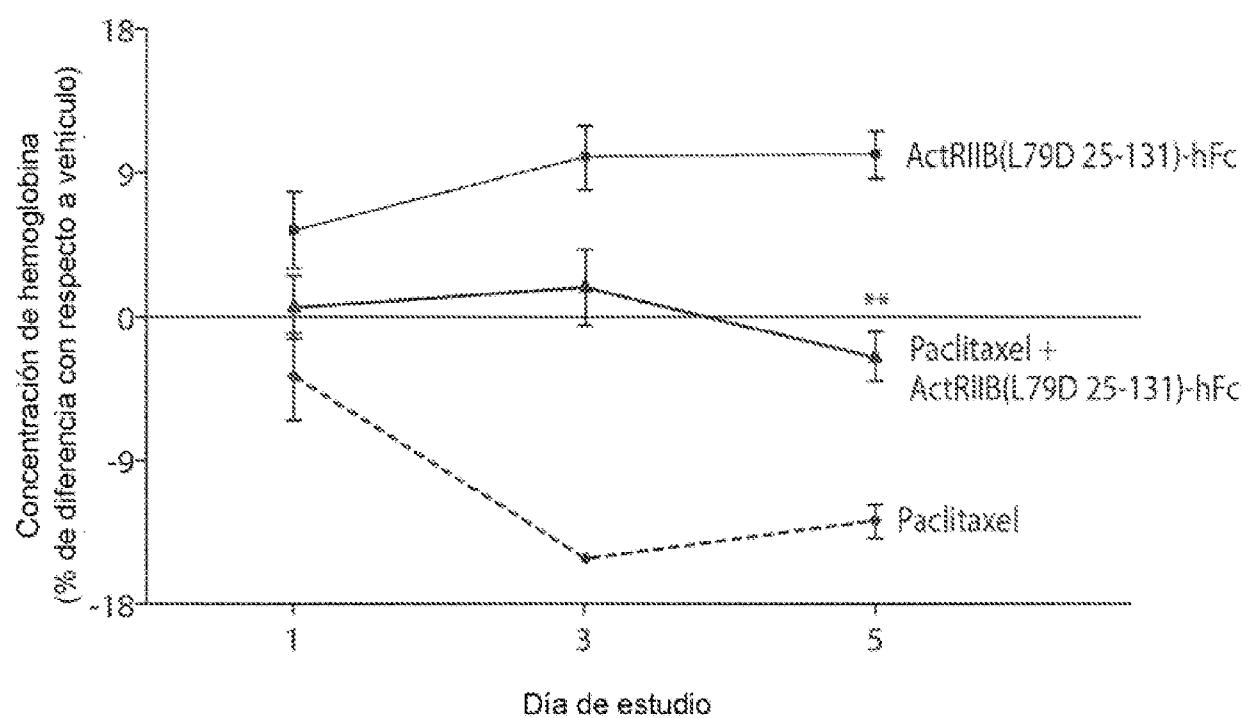


Fig. 11

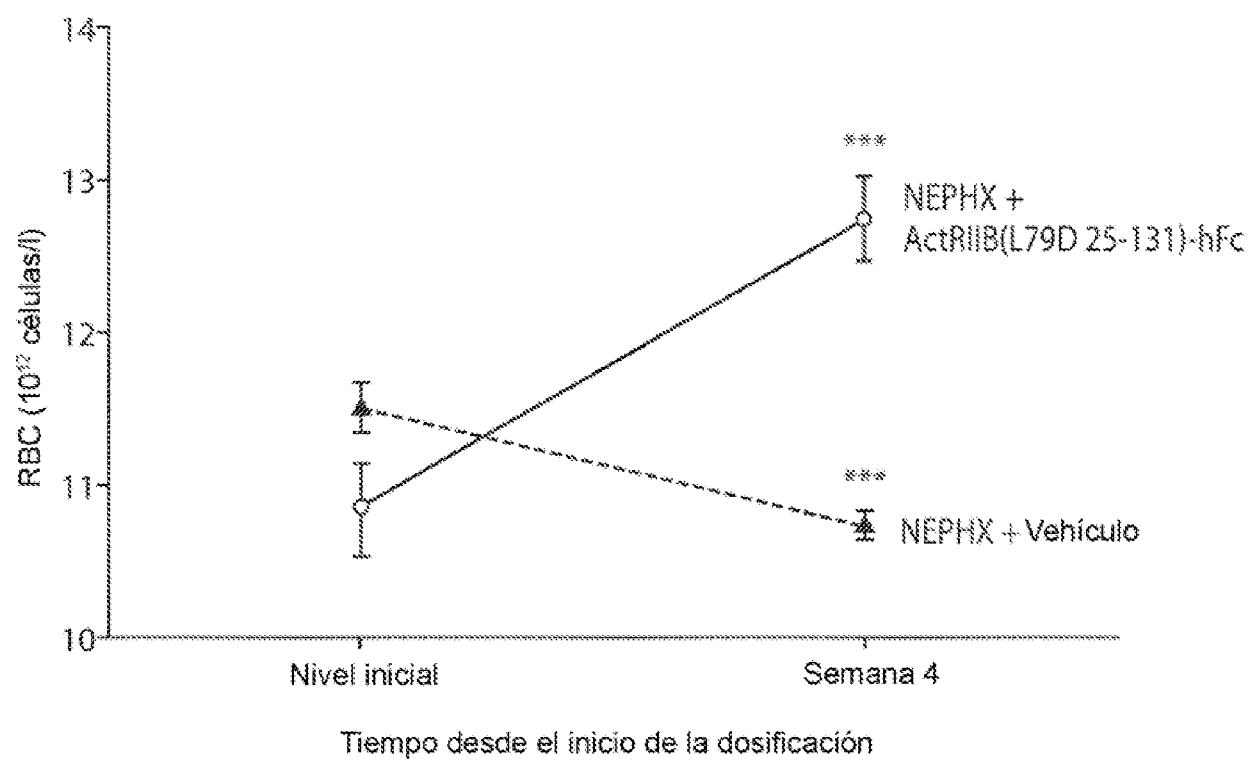


Fig. 12

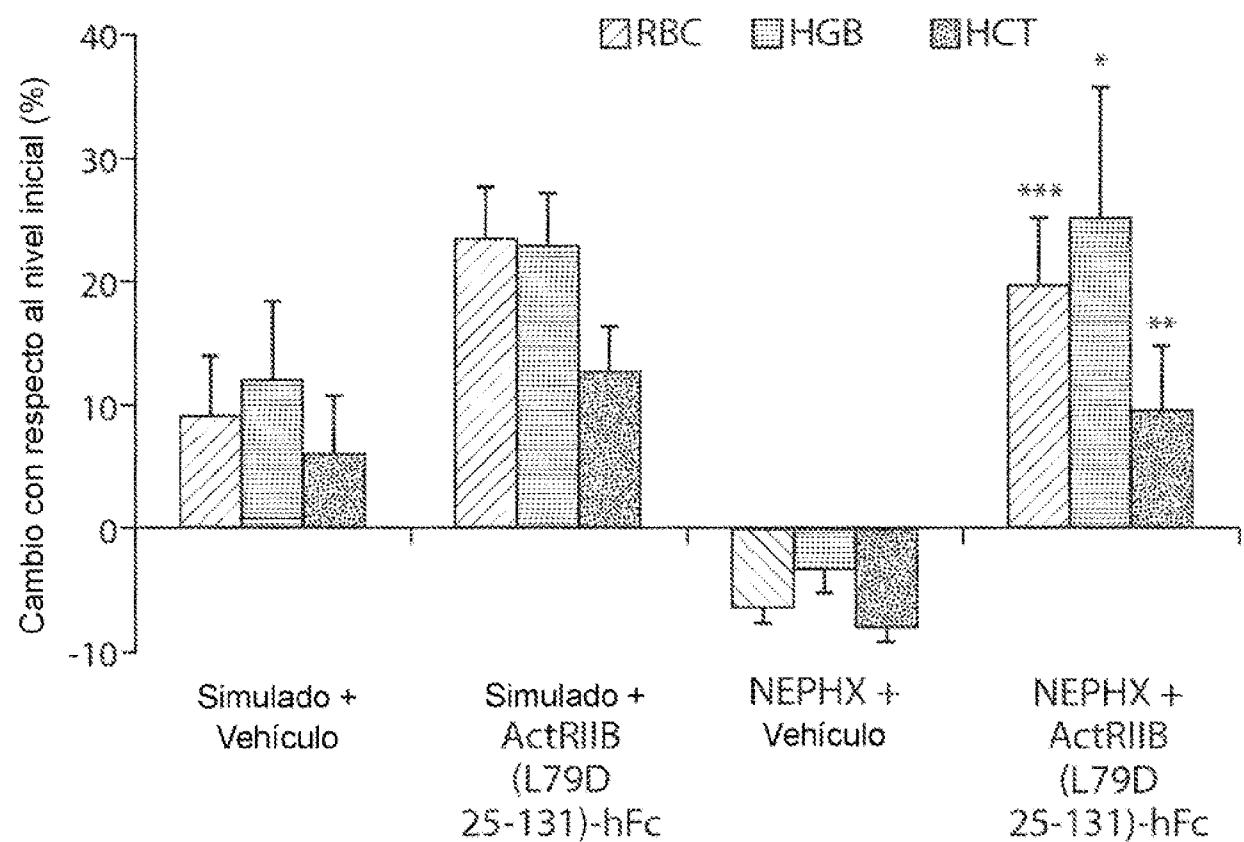


Fig. 13

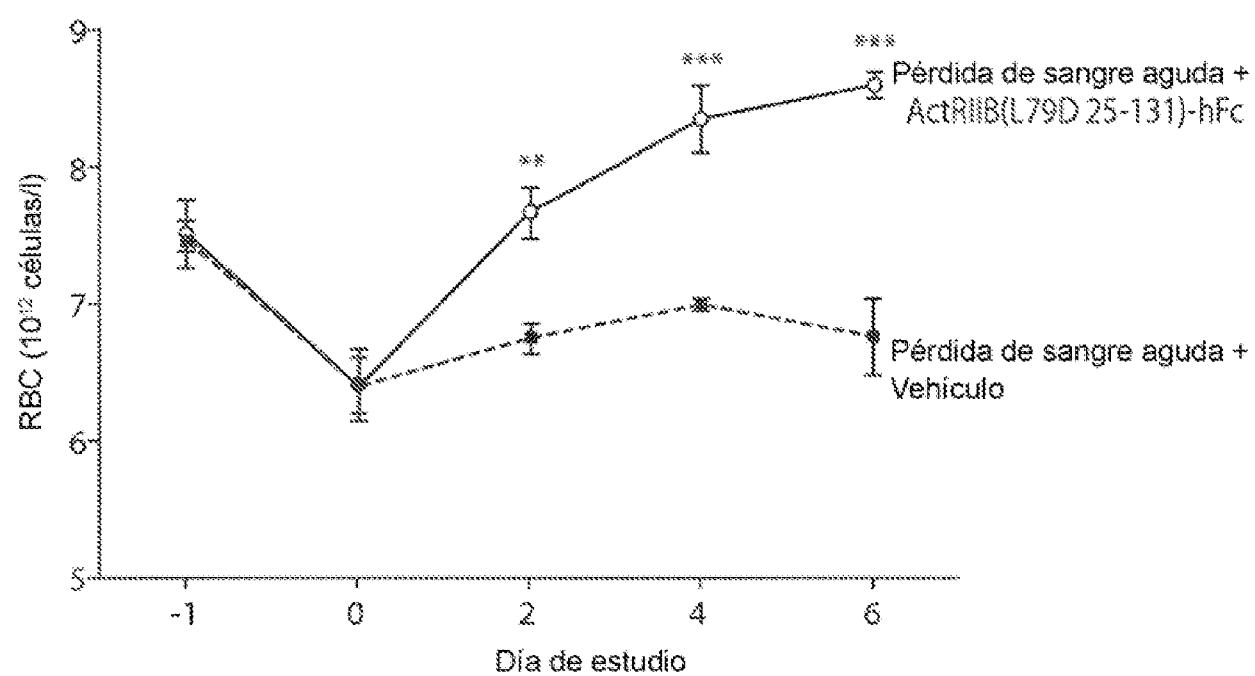


Fig. 14

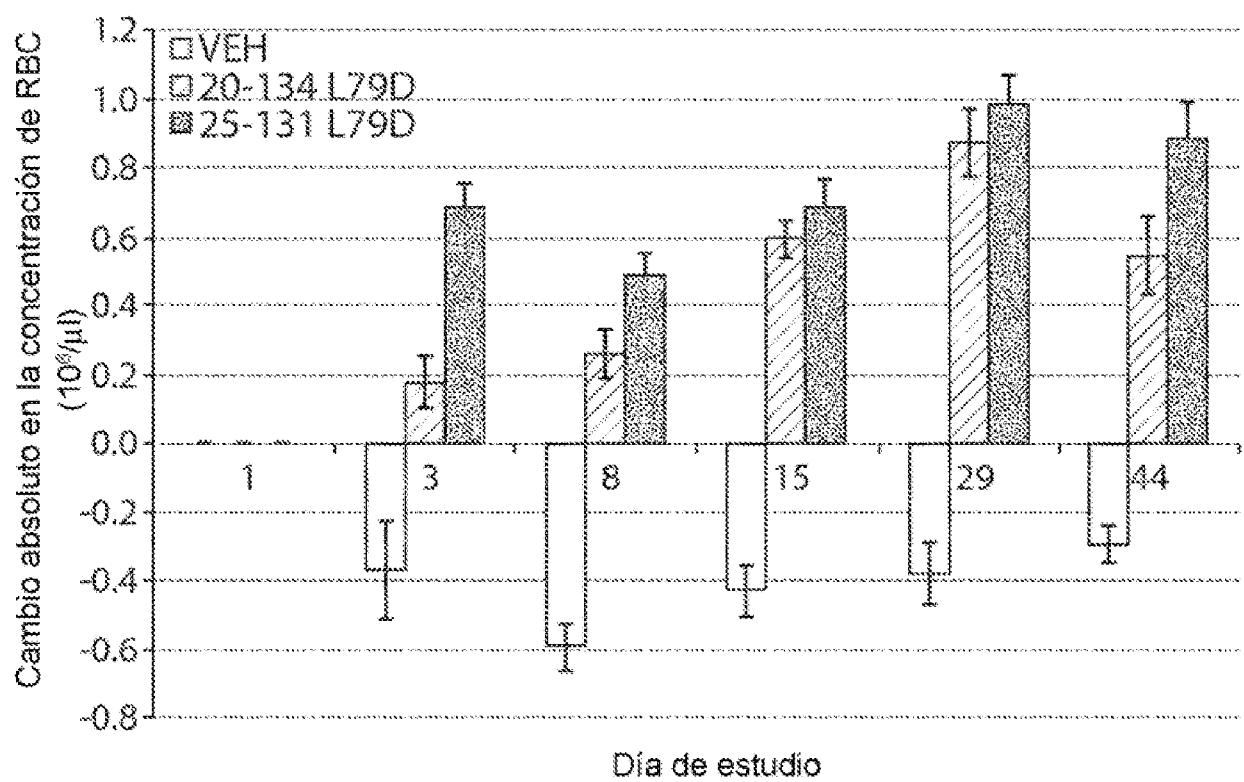


Fig. 15

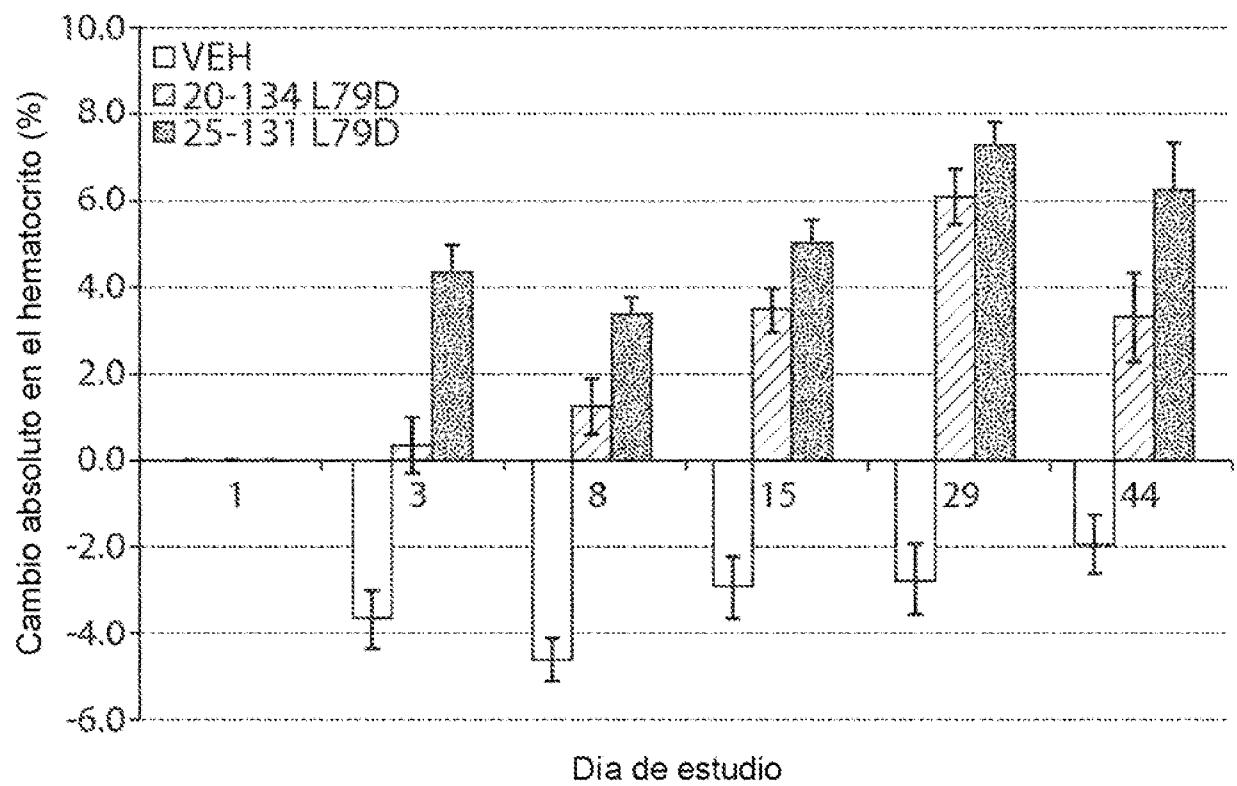


Fig. 16

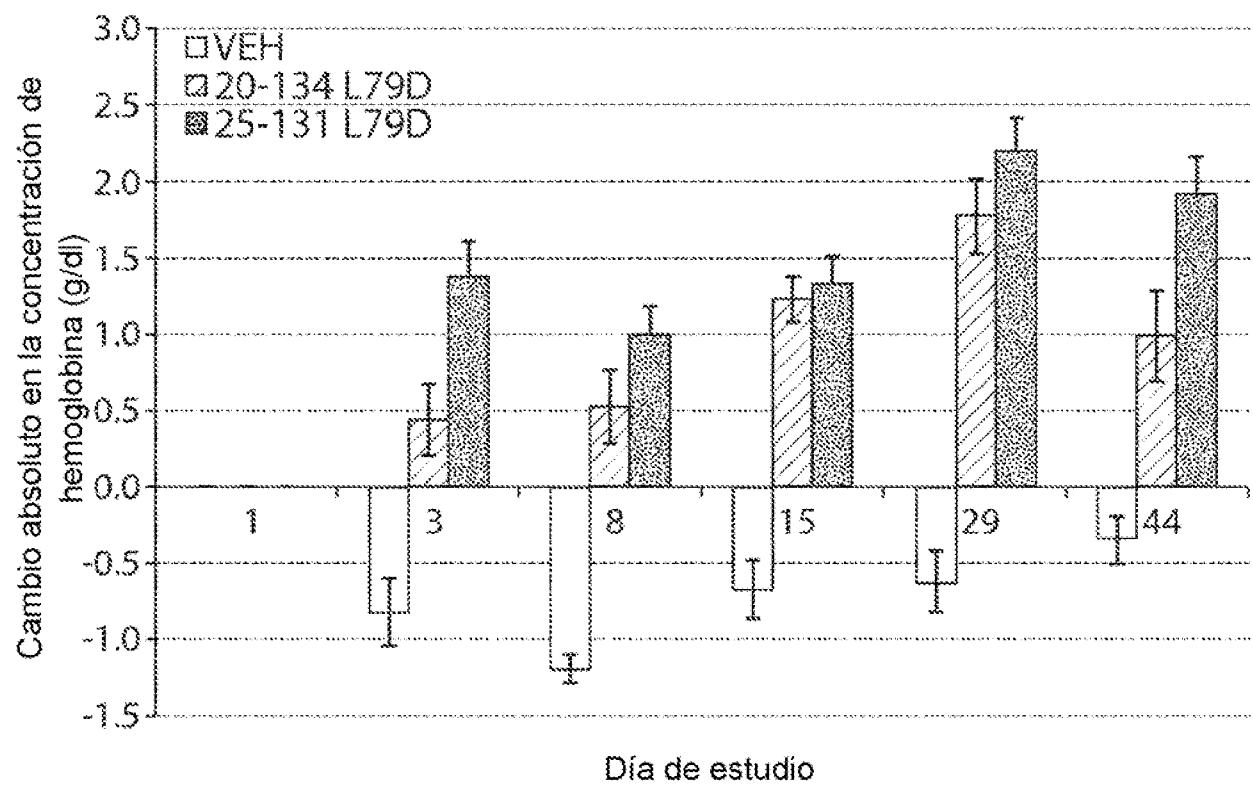


Fig. 17

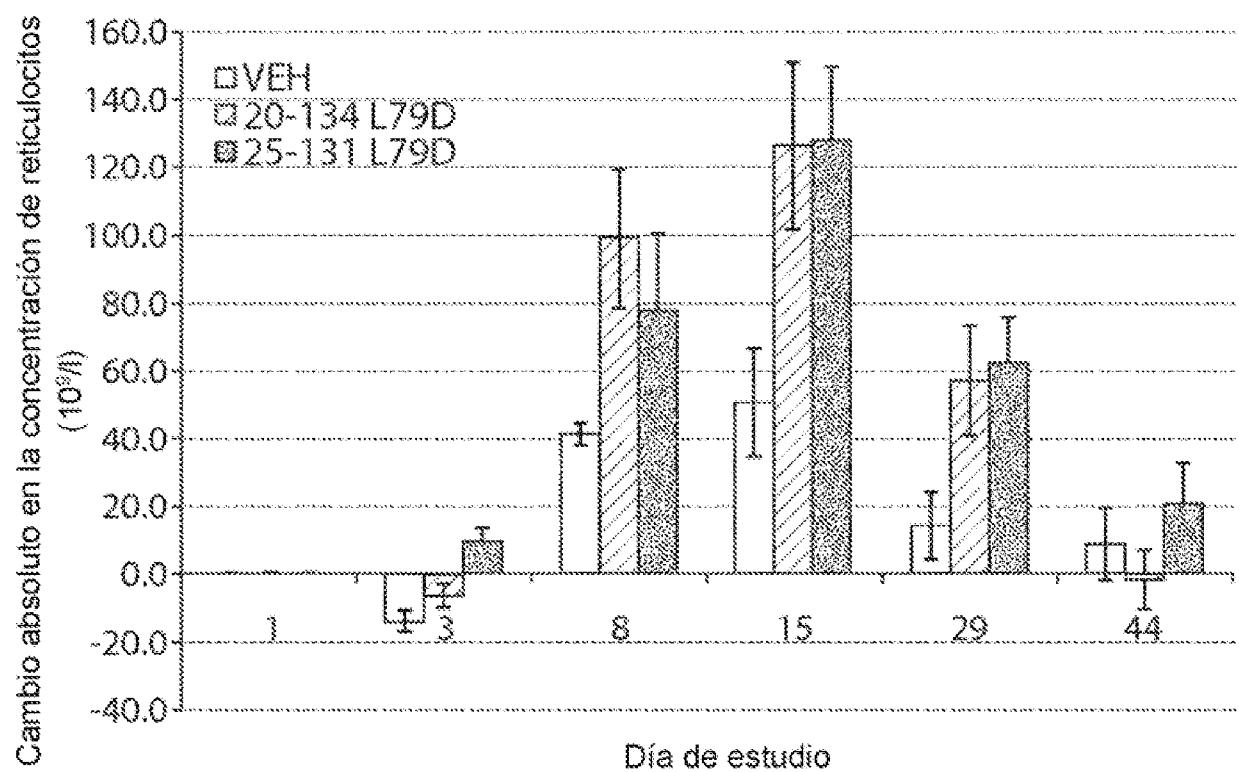


Fig. 18

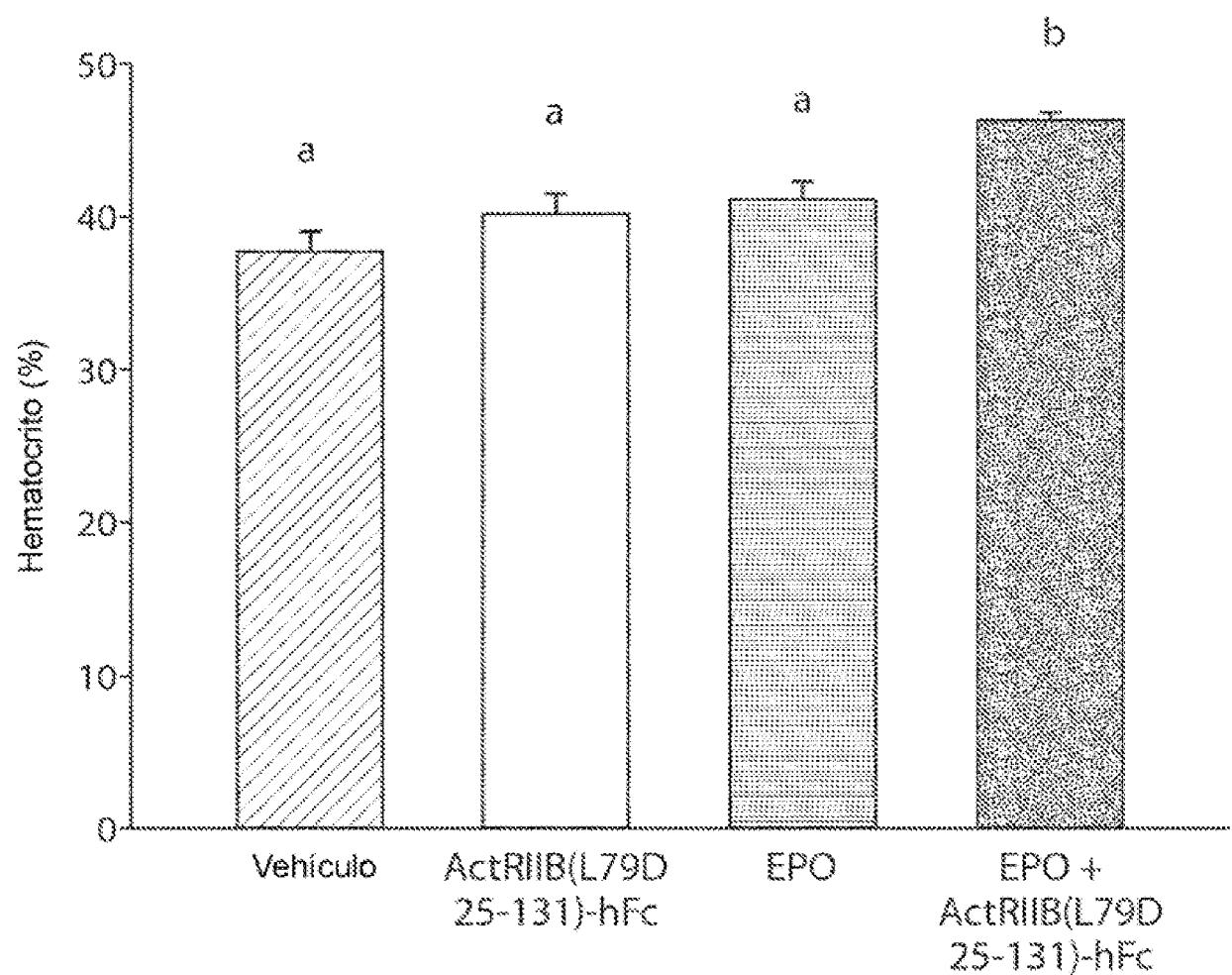


Fig. 19

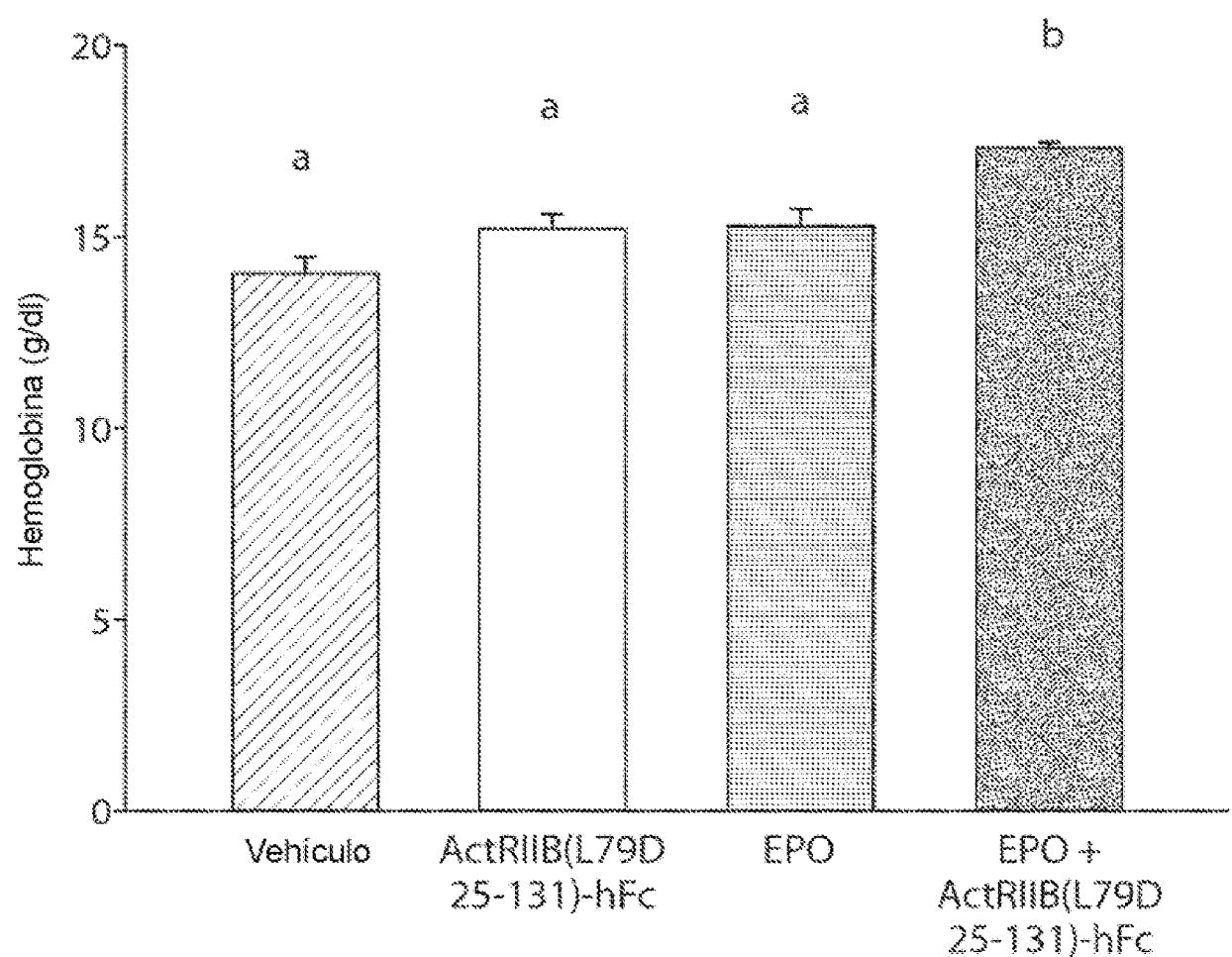


Fig. 20

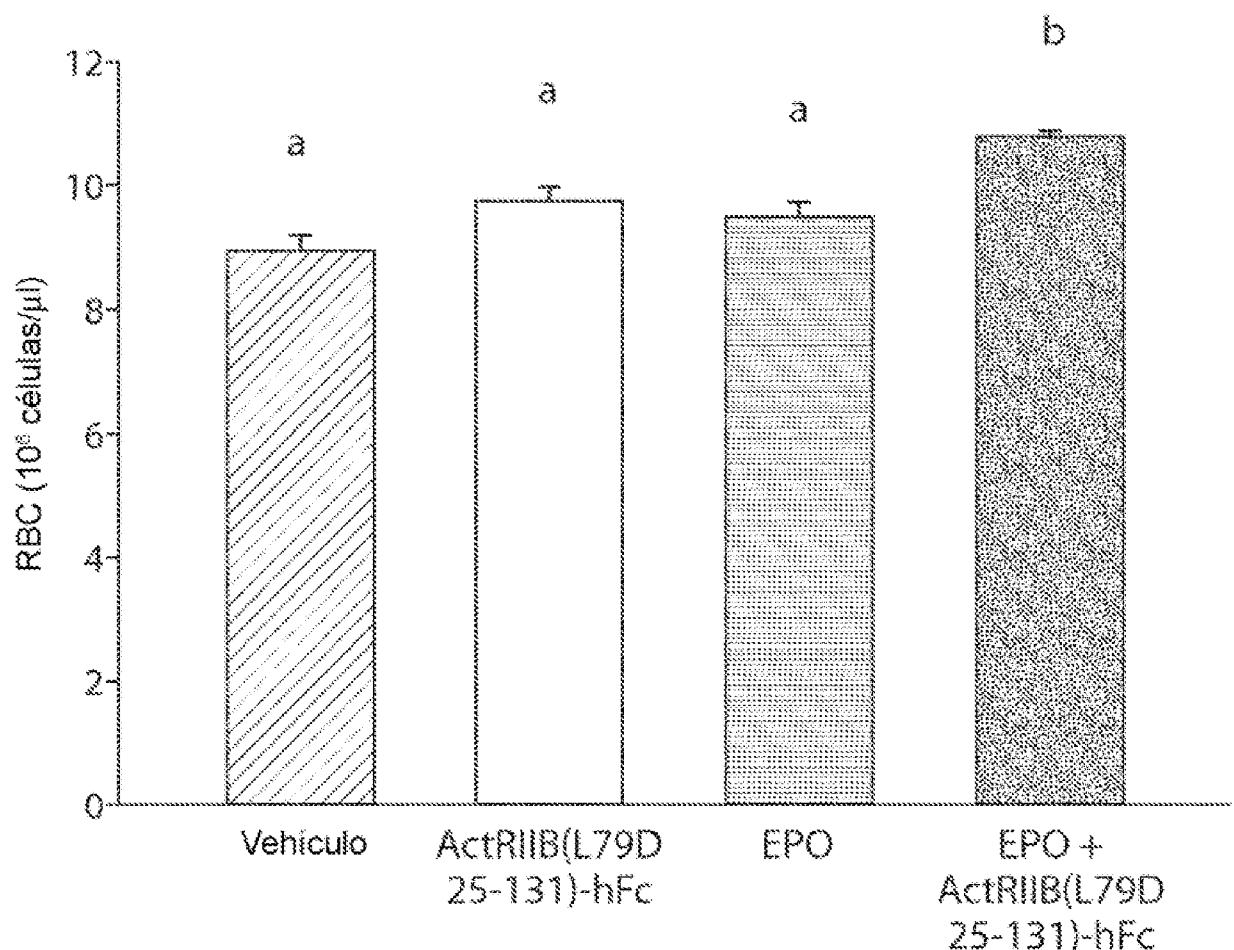


Fig. 21

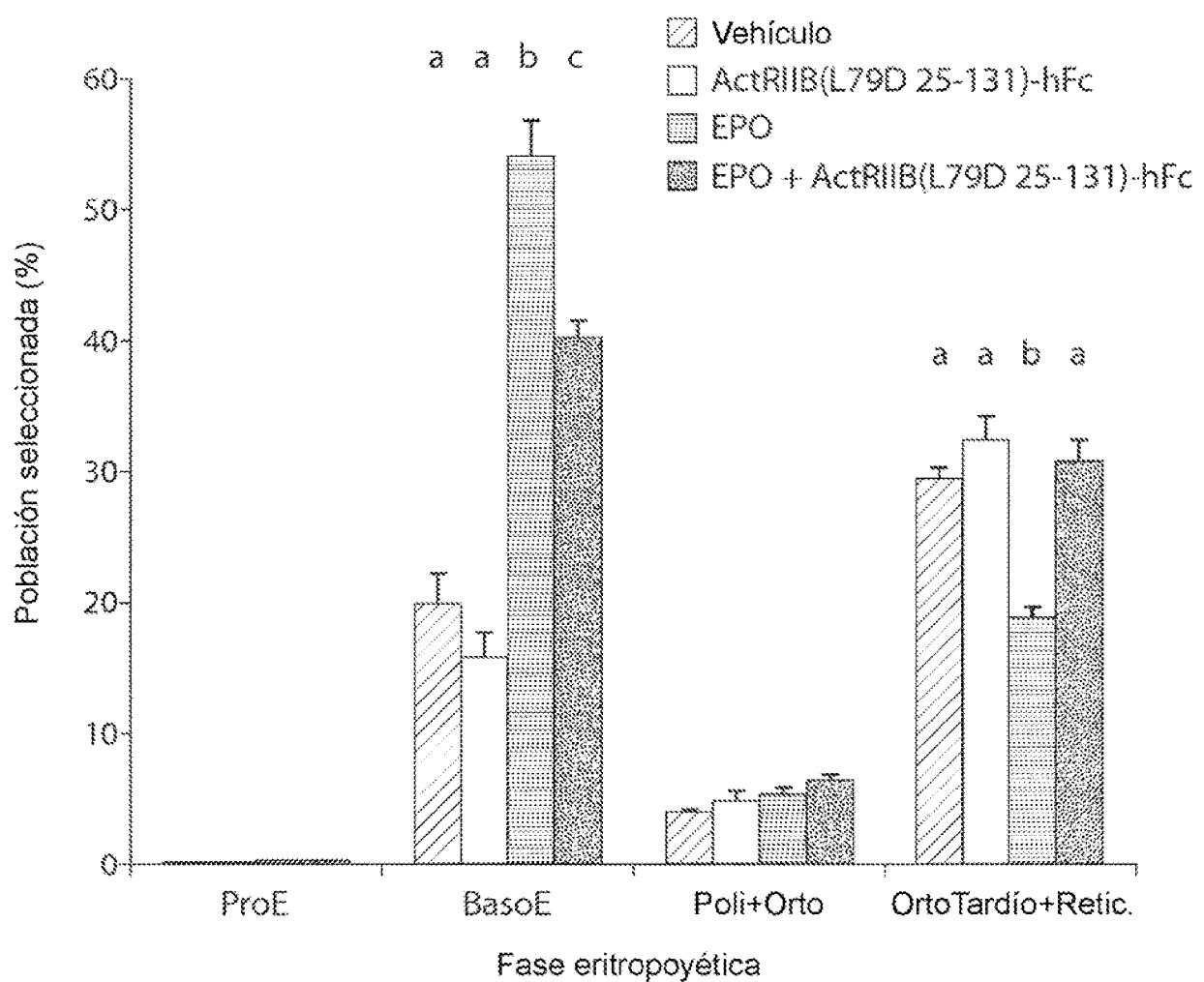


Fig. 22

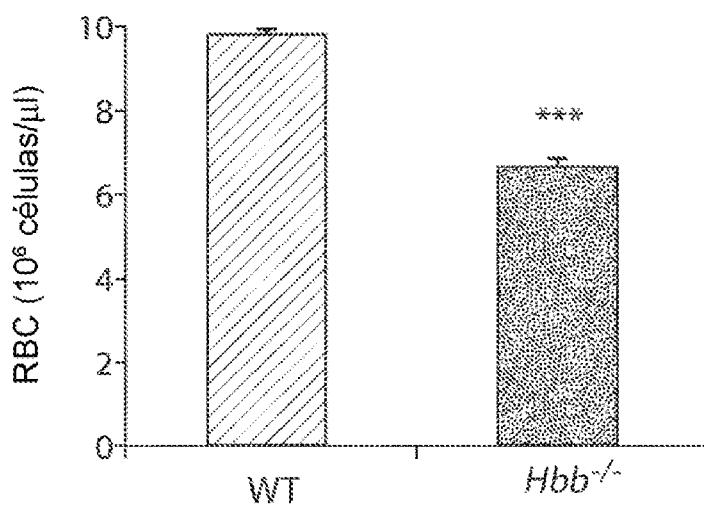


Fig. 23A

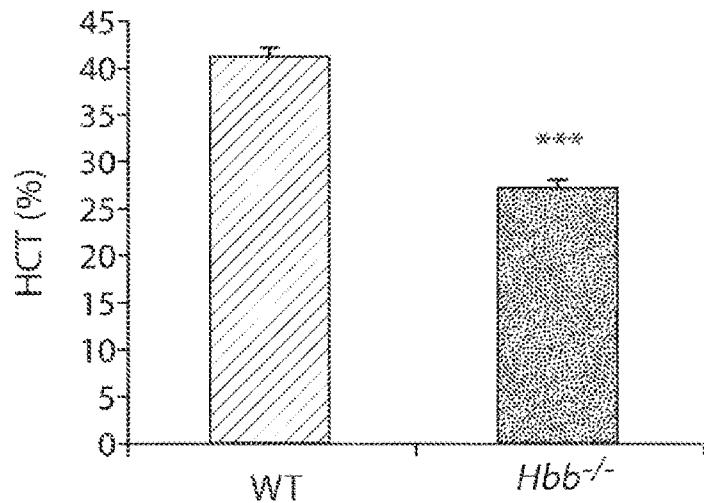


Fig. 23B

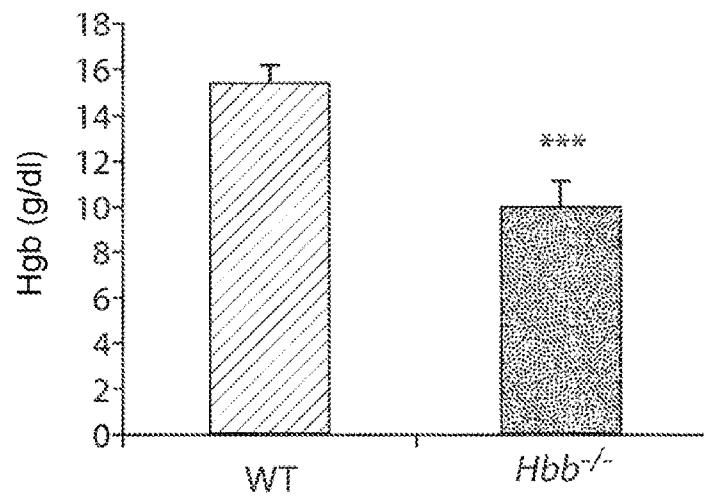


Fig. 23C

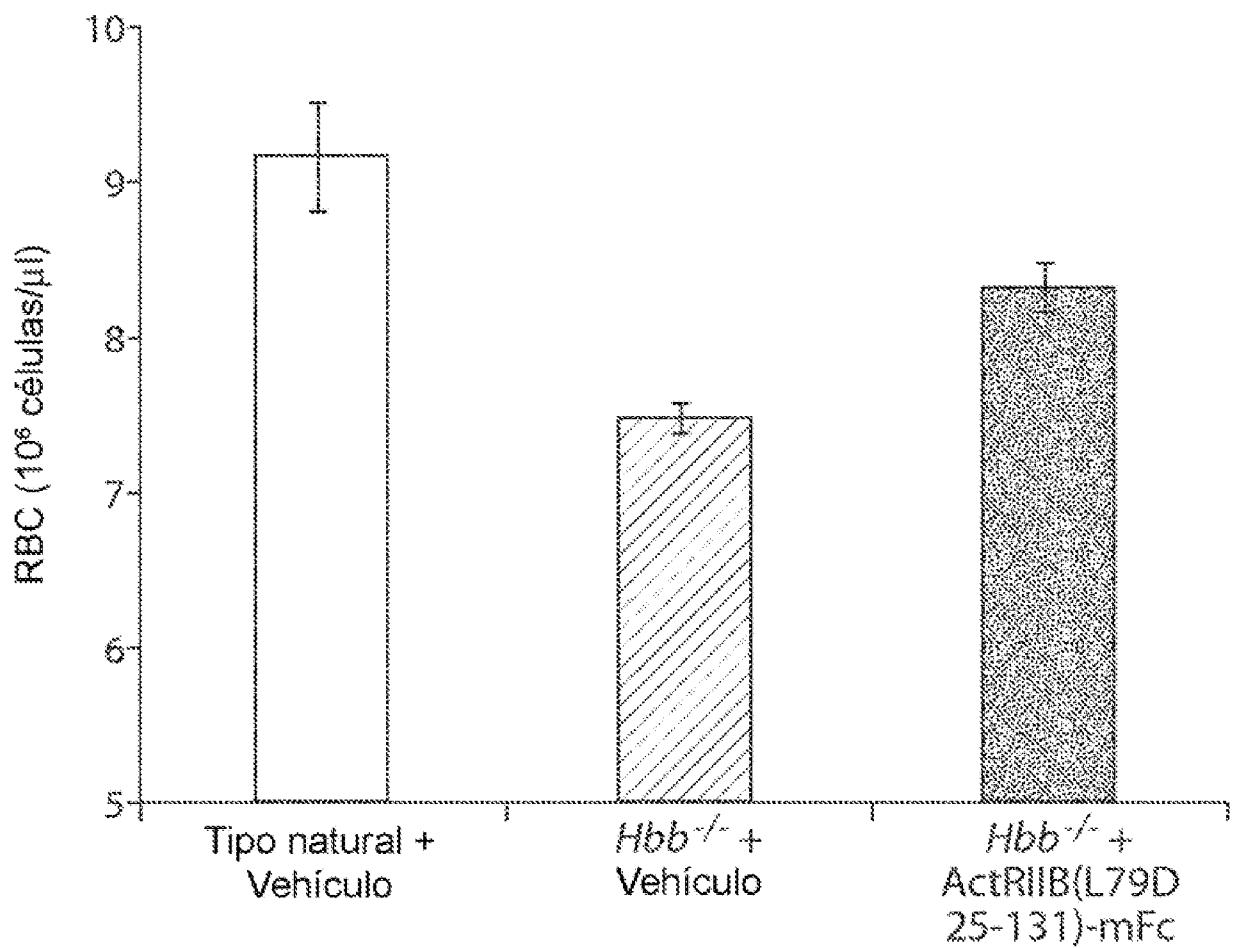


Fig. 24

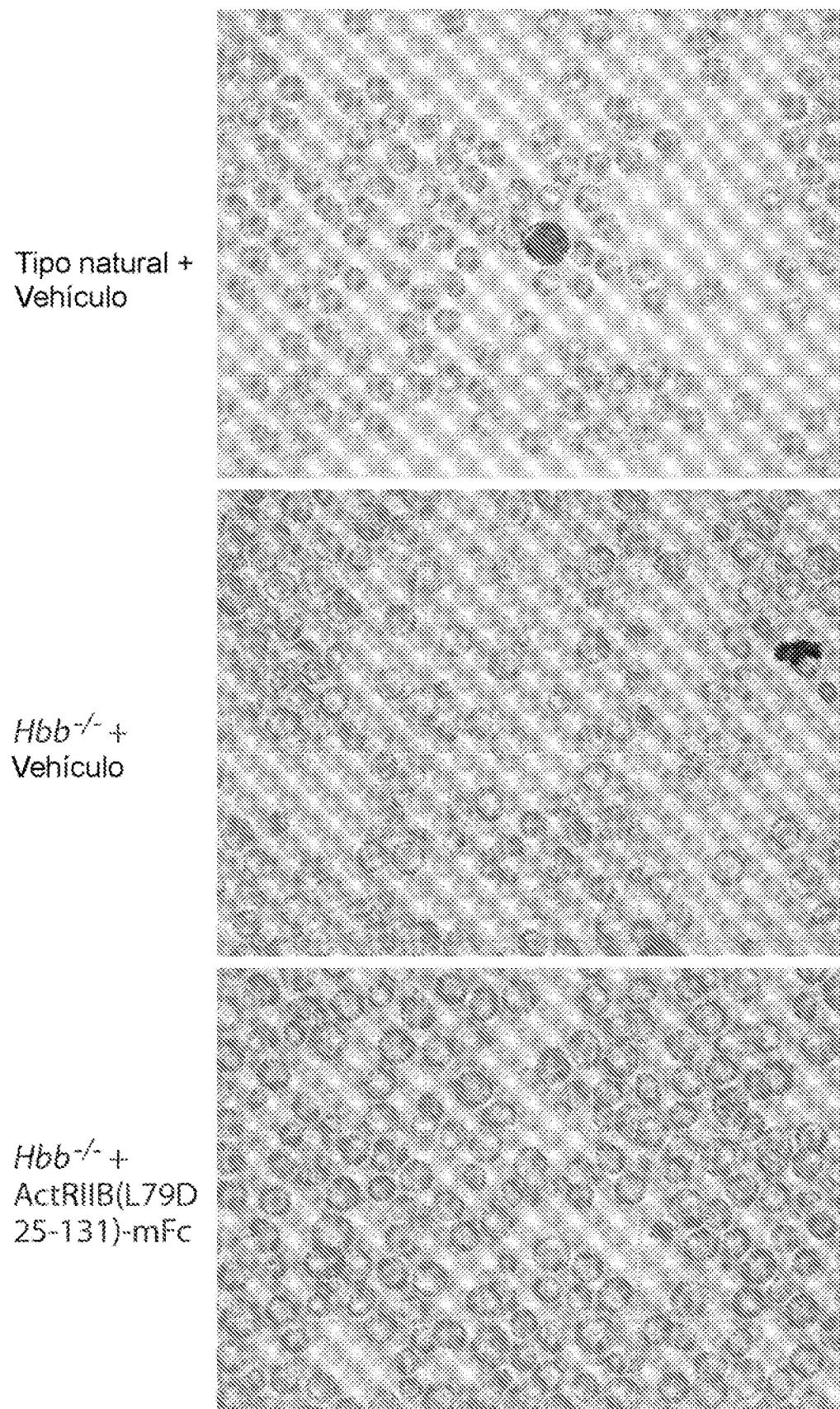


Fig. 25

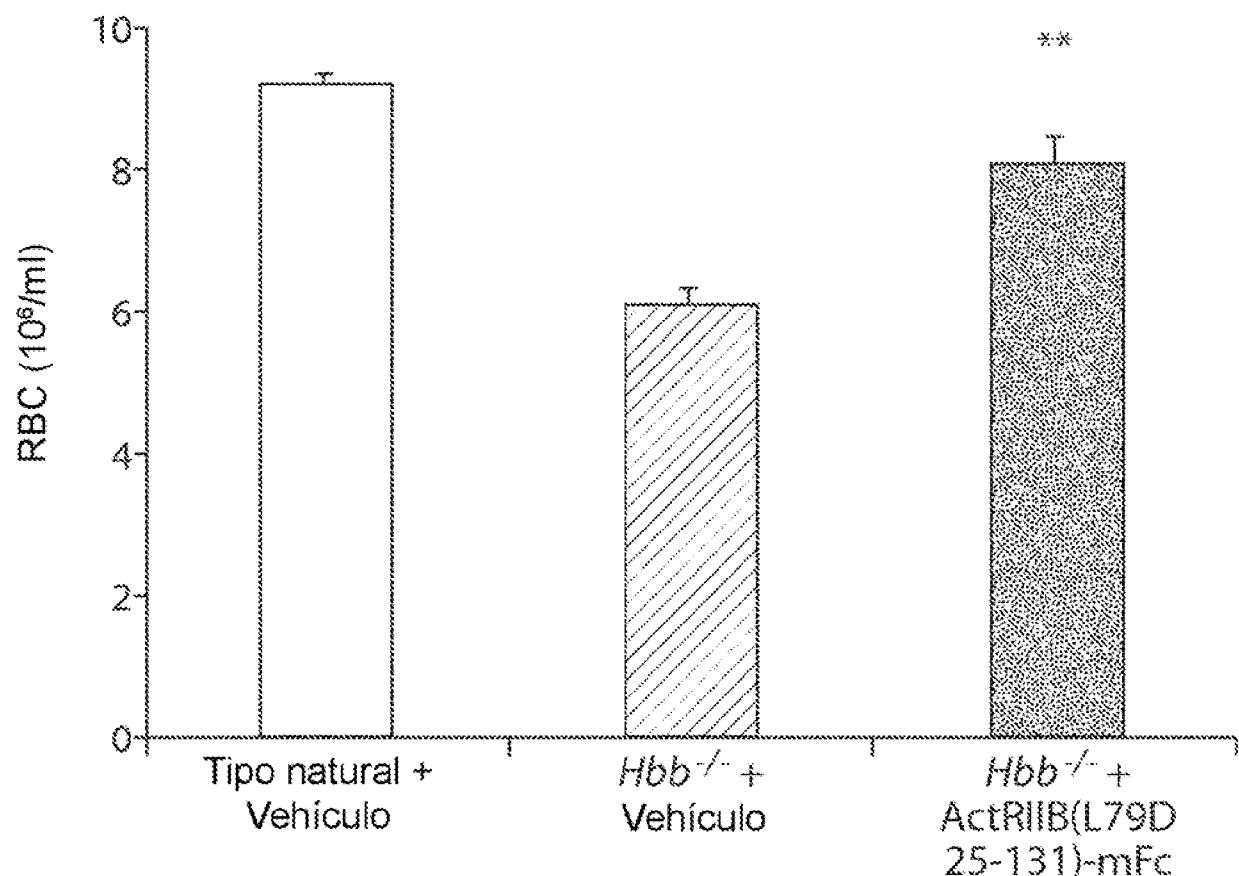


Fig. 26

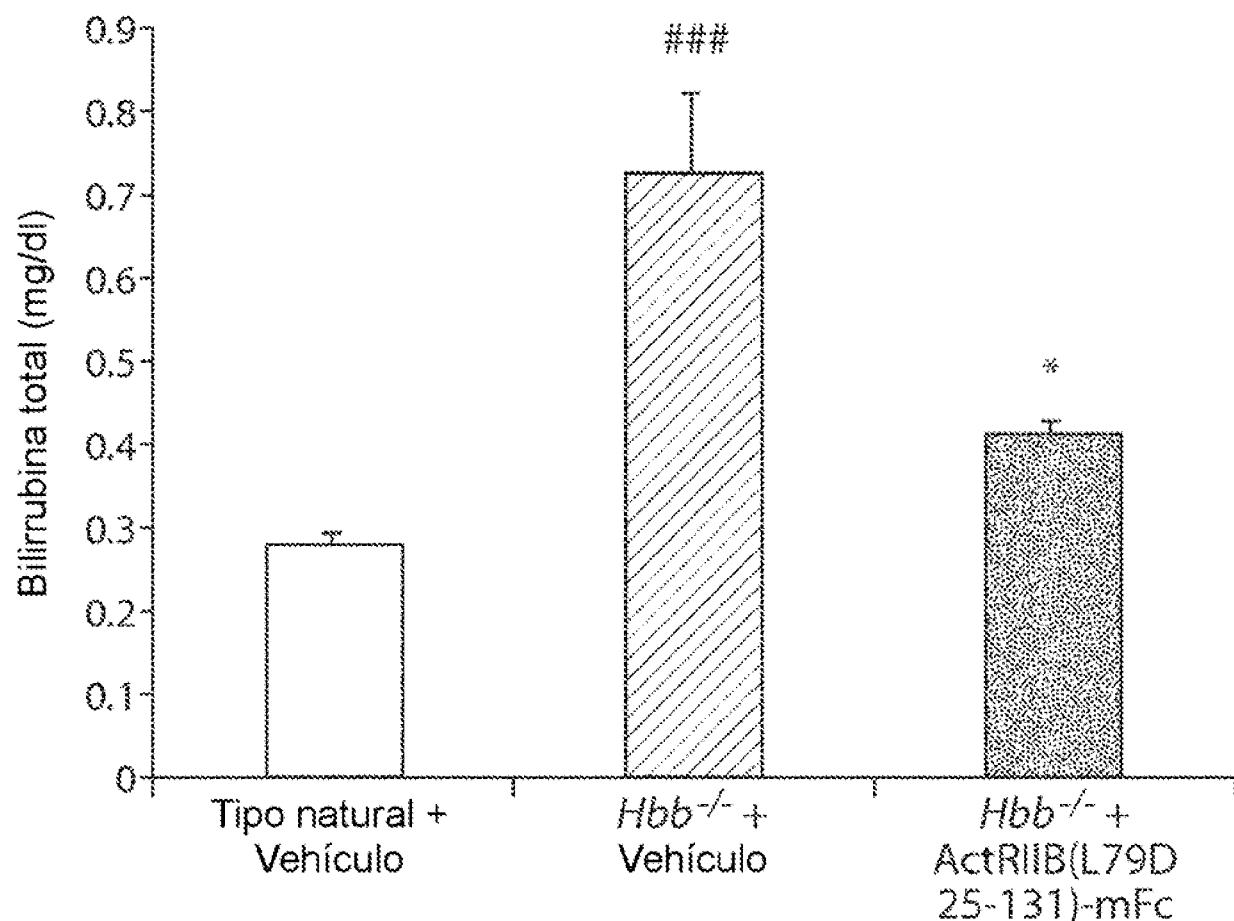


Fig. 27

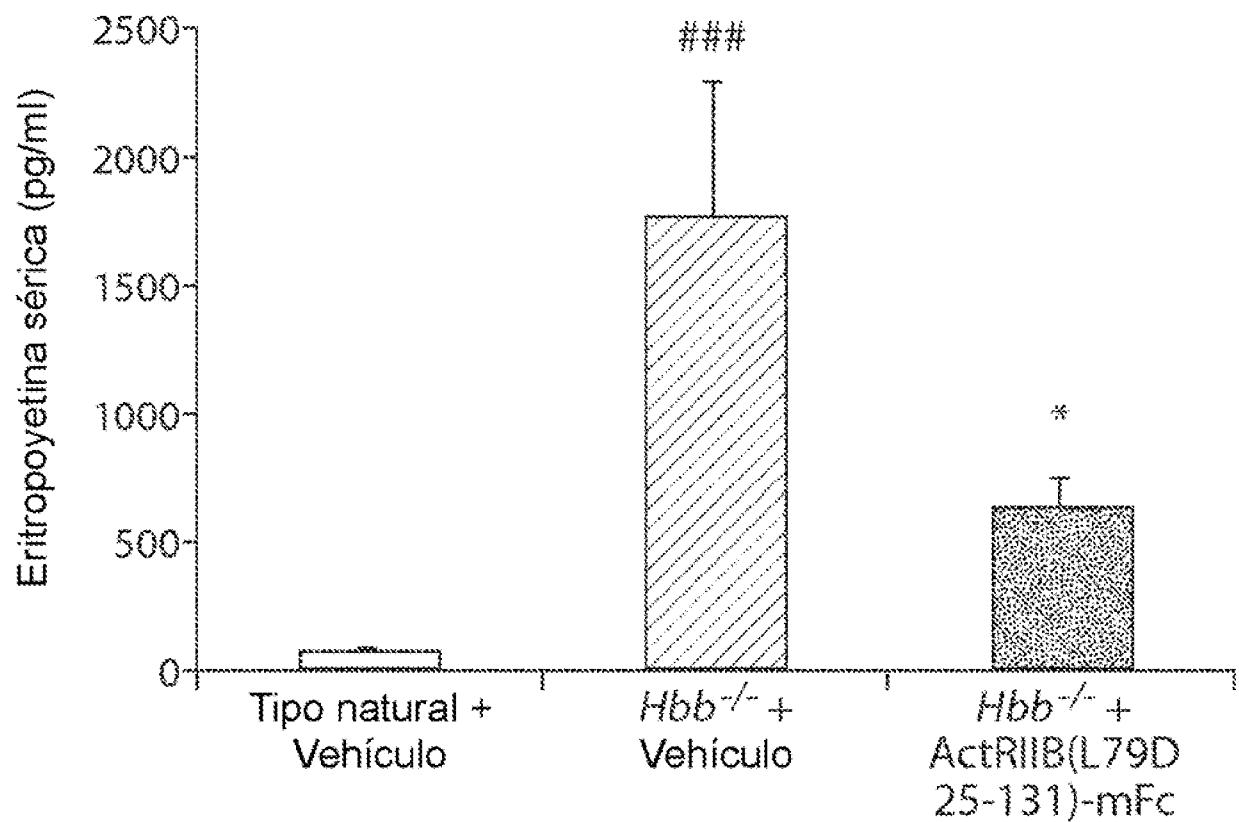


Fig. 28

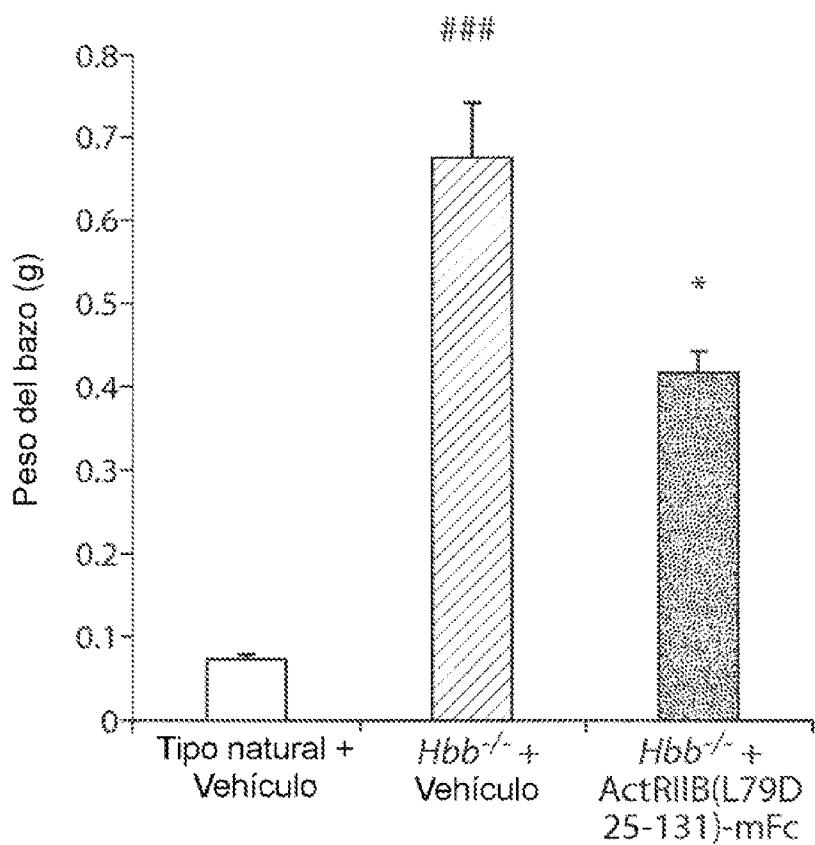


Fig. 29A

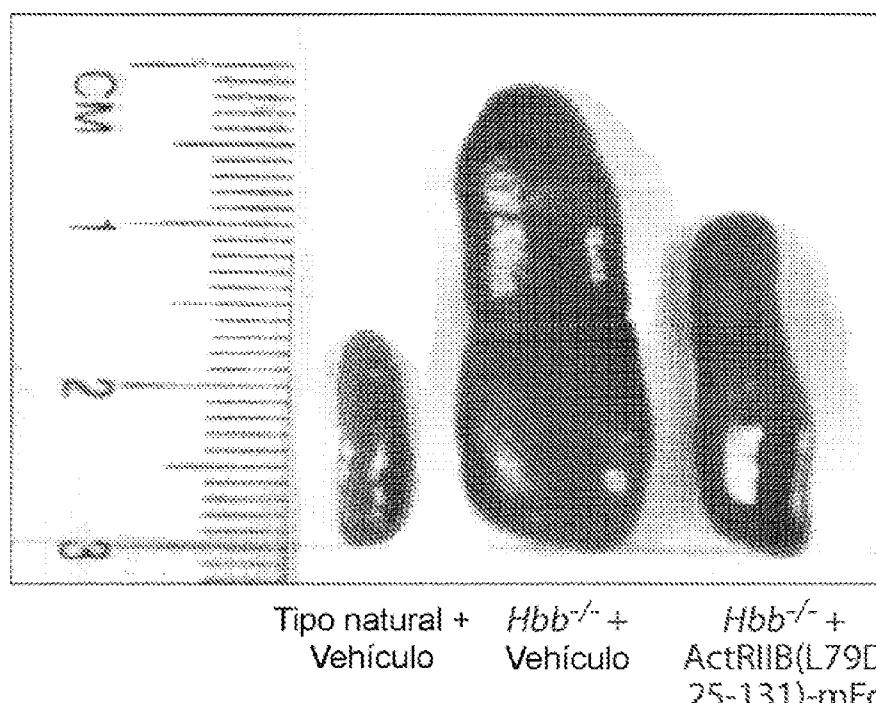


Fig. 29B

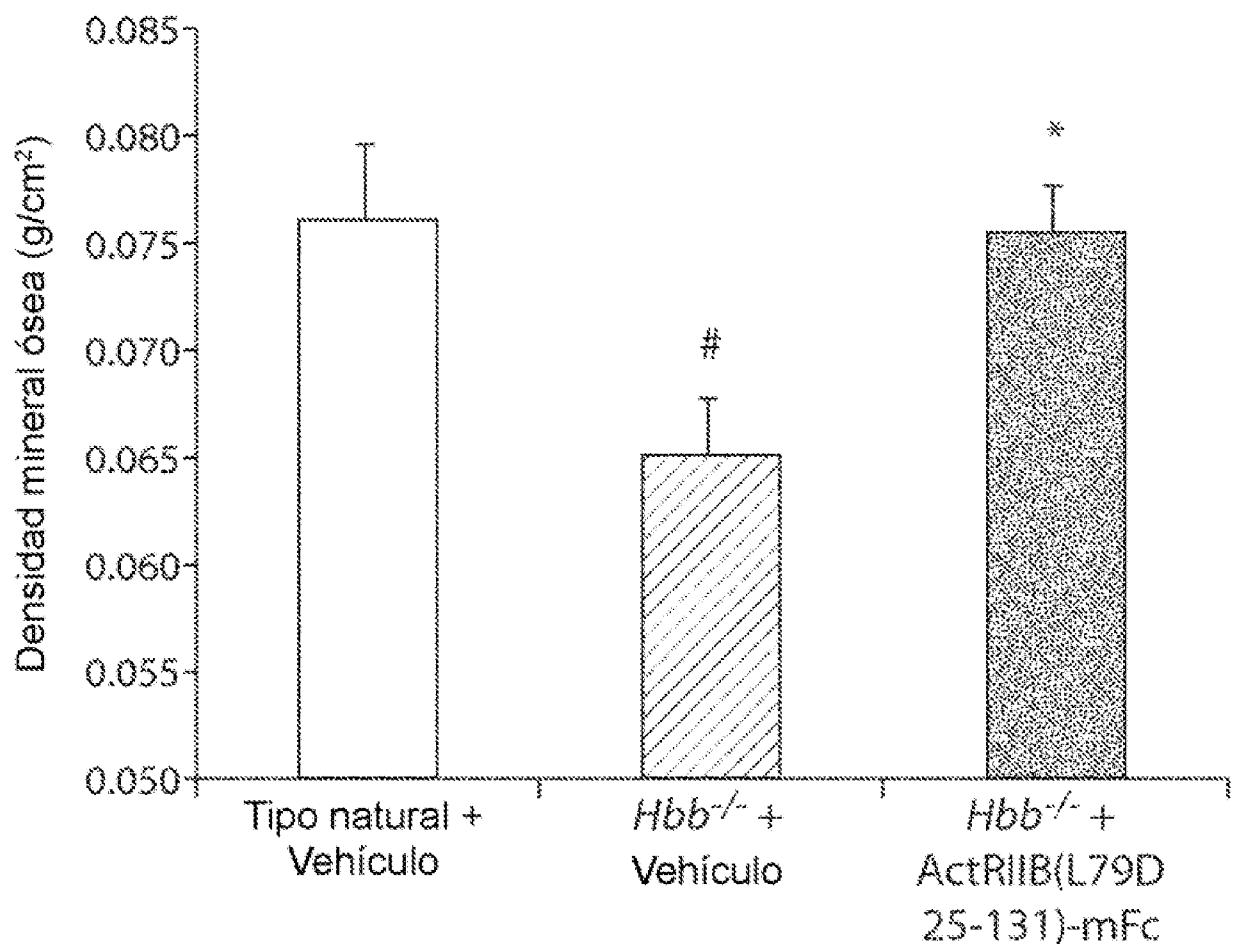


Fig. 30

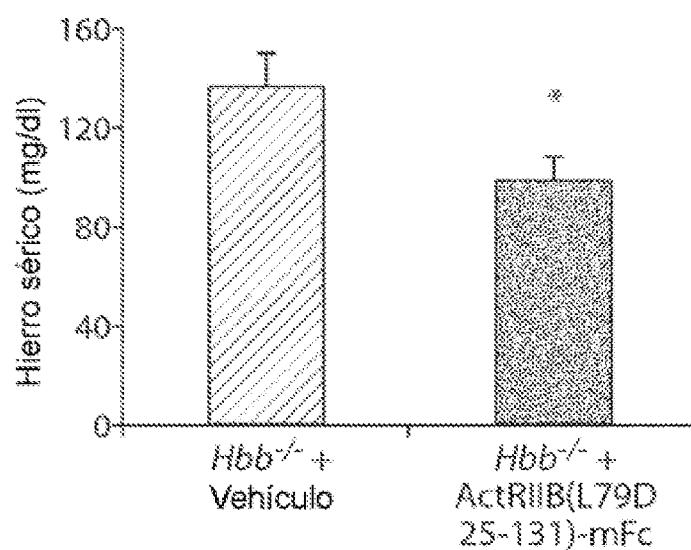


Fig. 31A

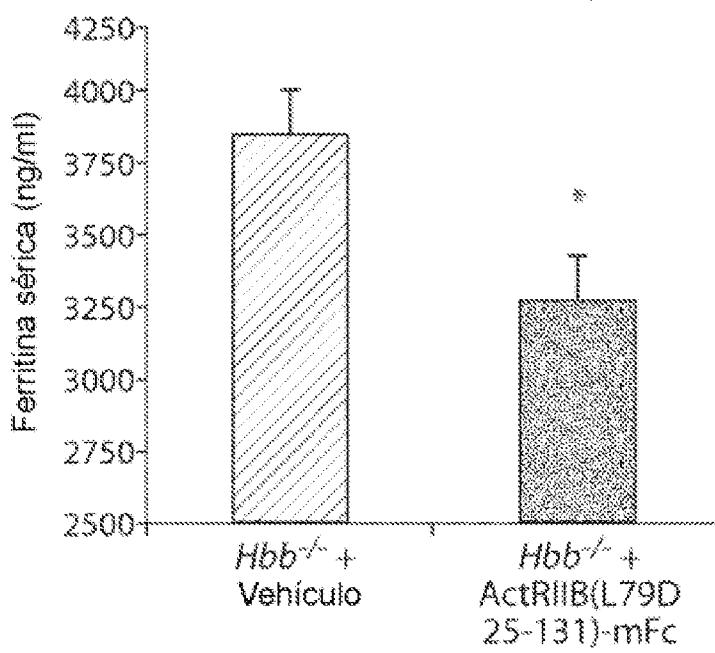


Fig. 31B

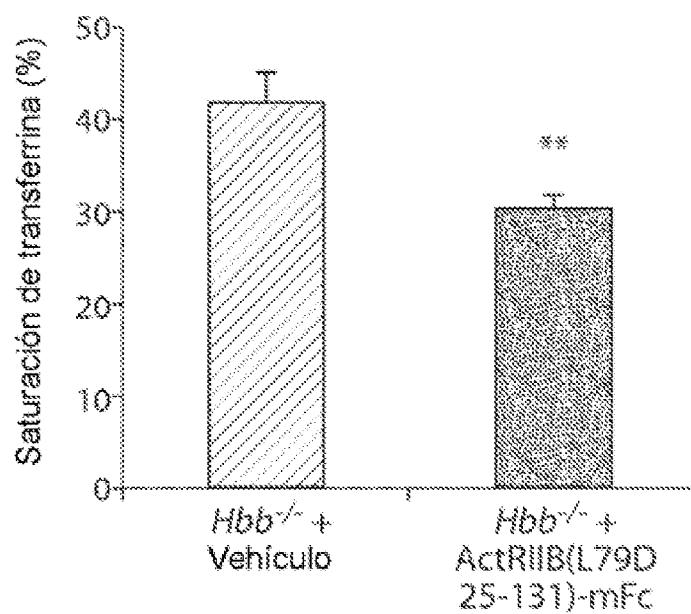


Fig. 31C

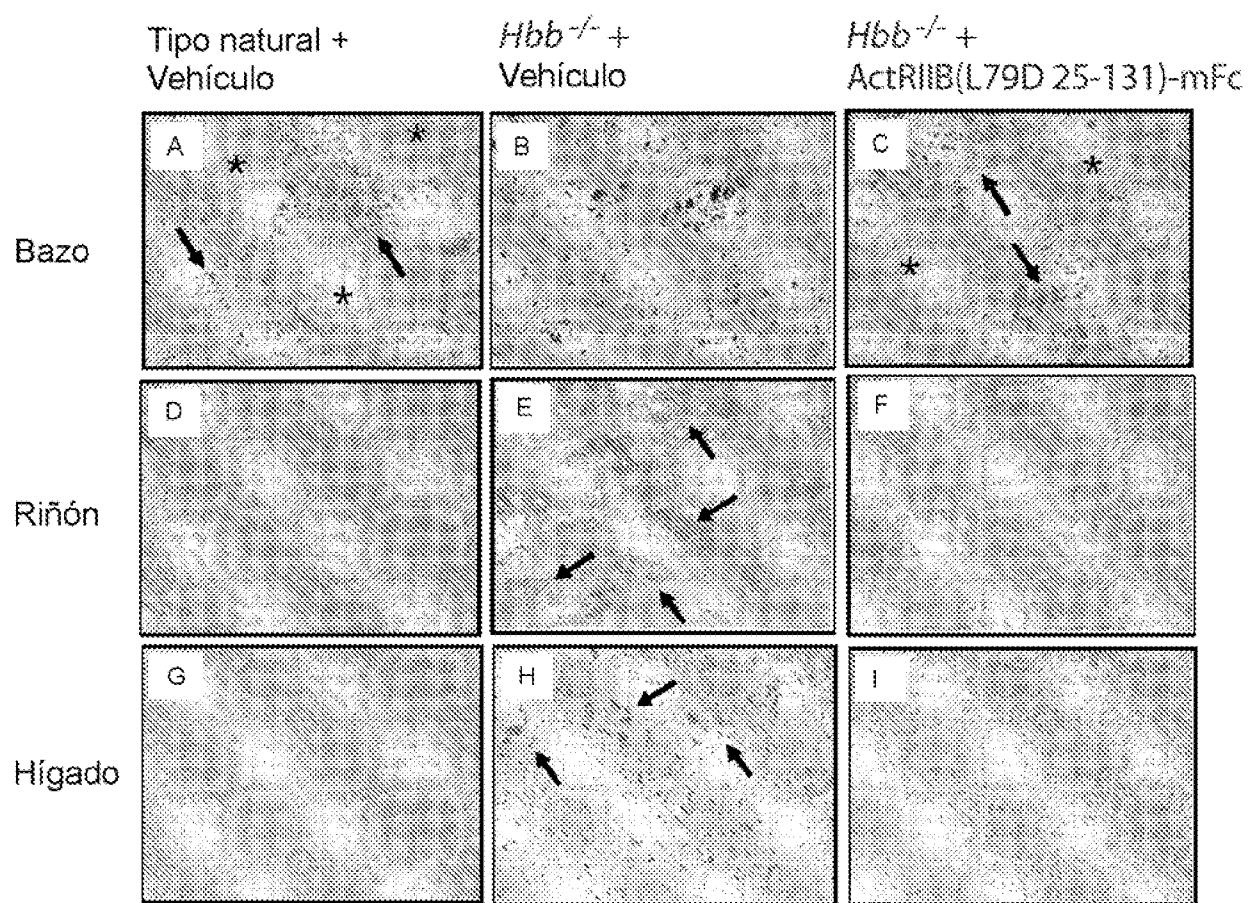


Fig. 32

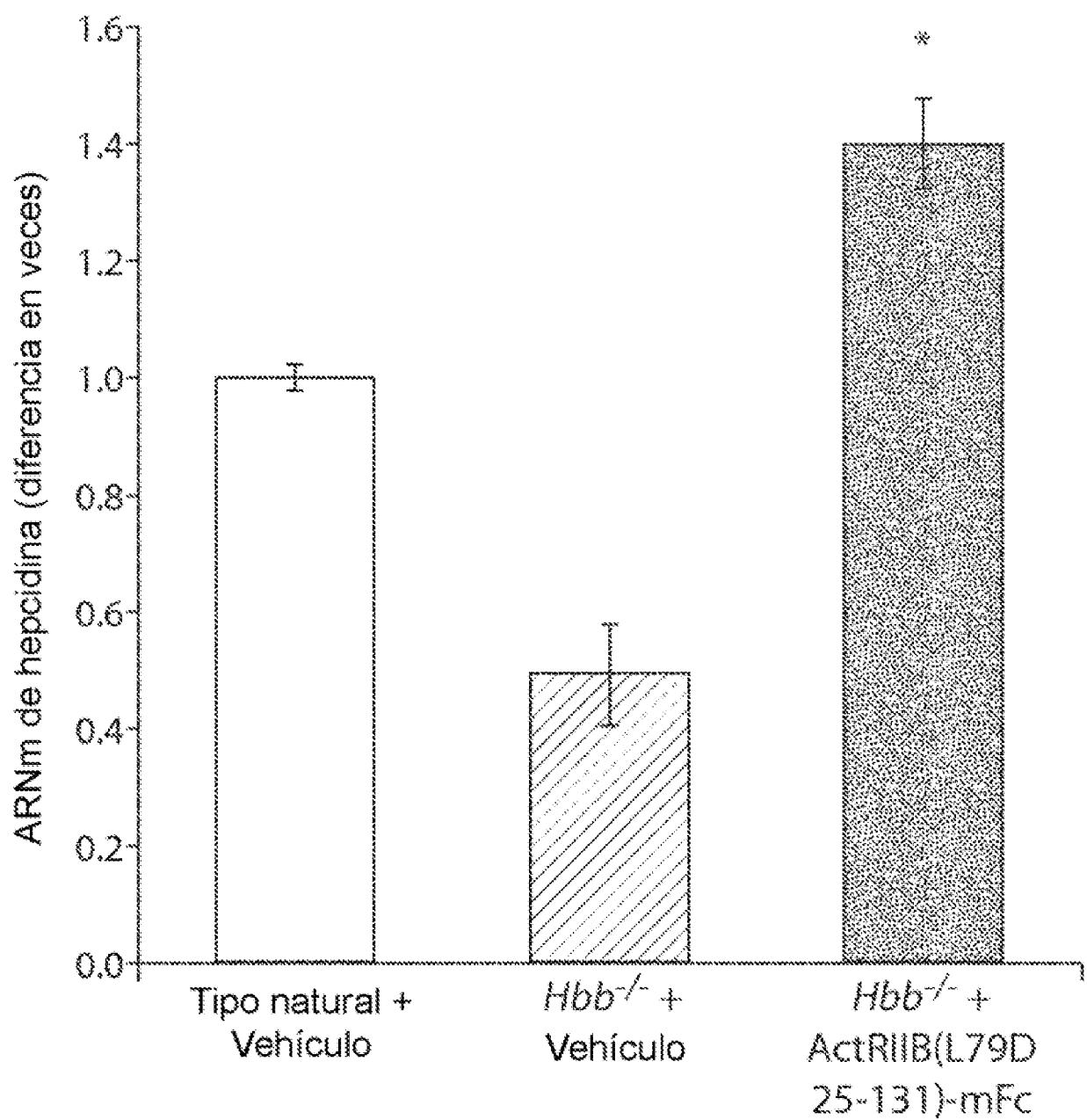


Fig. 33

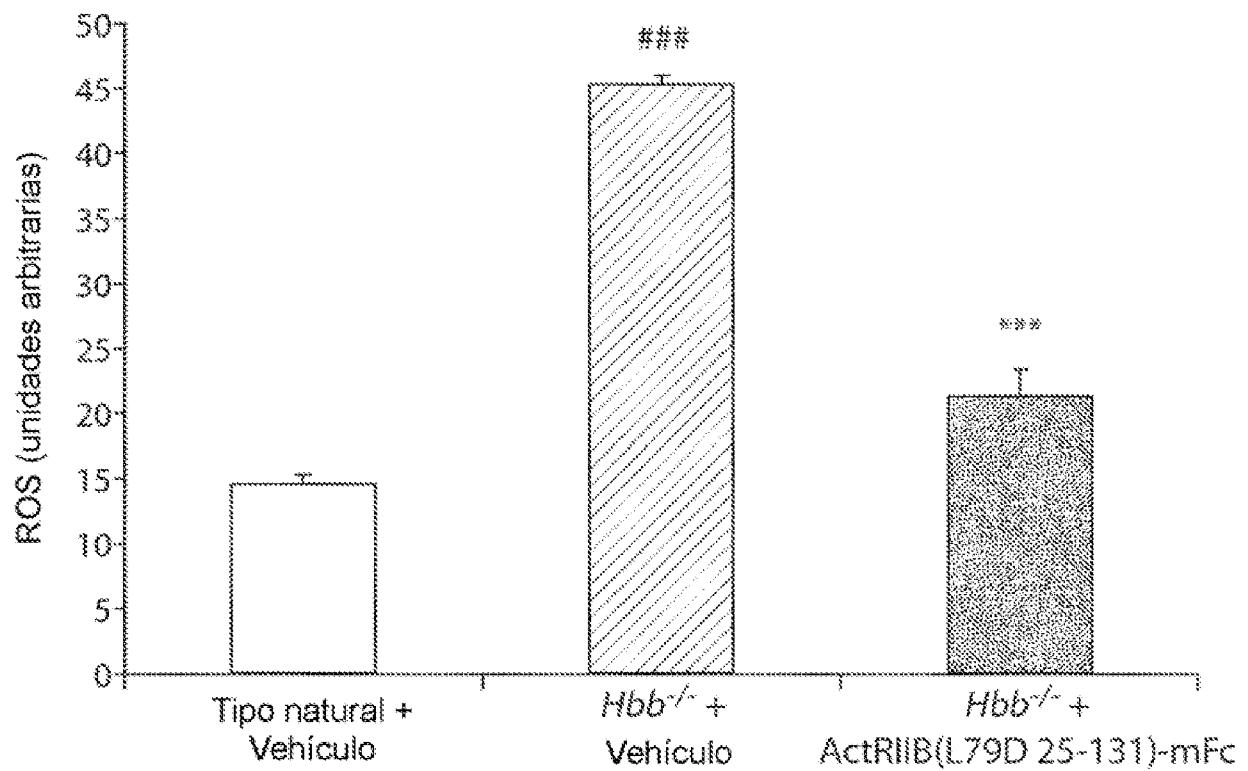


Fig. 34

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

Documentos citados en la descripción

- US 61547932 A [0001]
- US 6319499 B [0005] [0054]
- WO 2010015231 A [0024]
- WO 2011020045 A [0024]
- US 612662 A [0024]
- WO 0943731 A [0046]
- WO 2006012627 A [0052] [0067] [0101] [0106] [0201]
- WO 2009007541 A [0052]
- WO 0908822 A [0054]
- US 6278035 A [0054]
- WO 8705330 A [0092]
- WO 9826432 A [0126]
- US 5877198 A [0126]
- US 5262317 A [0127]
- US 5525480 A [0127]
- US 5865283 A [0127]
- US 5906388 A [0127]
- US 2008001500 W [0101]
- WO 2007053775 A [0241]

10

Literatura no patente citada en la descripción

- LIBOI et al. Proc Natl Acad Sci USA, vol. 90, 11351-11355 [0005]
- KOURY et al. Science, 1990, vol. 248, 378-381 [0005] [0055]
- WEATHERALL ; PROVAN. Lancet, 2003, vol. 355, 1168-1175 [0068]
- HURL et al. Nephrol Dial Transplant, 2000, vol. 15, 43-50 [0007]
- GLASPY et al. J Clin Oncol, 1997, vol. 15, 1218-1234 [0007]
- DEMETRI et al. J Clin Oncol, 1998, vol. 16, 3412-3425 [0007]
- ESTEY. Curr Opin Hematol, 2003, vol. 10, 60-67 [0007] [0251]
- KRAPP et al. Clin J Am Soc Nephrol, 2009, vol. 4, 470-480 [0007] [0251]
- GLASPY. Annu Rev Med, 2009, vol. 60, 181-192 [0007] [0251]
- JELKMANN et al. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, vol. 57, 39-61 [0007]
- TANNO. Adv Hematol, 2010, vol. 2010, 356283 [0008]
- GROBET et al. Nat Genet, 1997, vol. 17 (3), 71-4 [0043]
- SCHUELKE et al. N Engl J Med, 2004, vol. 350, 2682-8 [0043]
- MASSAGUÉ. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, vol. 1, 169-178 [0044]
- MATHEWS ; VALE. Cell, 1991, vol. 65, 973-982 [0045]
- ATTISANO et al. Cell, 1992, vol. 69, 97-108 [0045]
- YAMASHITA et al. J. Cell Biol, 1995, vol. 130, 217-226 [0045]
- LEE ; MCPHERRON. Proc. Natl. Acad. Sci., 2001, vol. 98, 9308-9311 [0045]
- YEO ; WHITMAN. Mol. Cell, 2001, vol. 7, 849-857 [0045]
- OH et al. Genes Dev., 2002, vol. 16, 2748-54 [0045]
- DEPAOLO et al. Proc Soc Exp Biol Med., 1991, vol. 228, 502-512 [0045]
- DYSON et al. Curr Biol, 1997, vol. 7, 81-84 [0046]
- WOODRUFF. Biochem Pharmacol, 1999, vol. 55, 953-963 [0046]
- MURATA et al. PNAS, 1998, vol. 95, 2434 [0046]
- SAKUMA et al. Genes Cells, 2002, vol. 7, 401-12 [0047]
- MCPHERRON et al. Nature, 1997, vol. 387, 83-86 [0048]
- ASHMORE et al. Growth, 1974, vol. 38, 571-587 [0048]
- SWATLAND ; KIEFFER. J. Anim. Sci., 1994, vol. 38, 752-757 [0048]
- MCPHERRON ; LEE. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, vol. 94, 12467-12481 [0048]
- KAMBADUR et al. Genome Res., 1997, vol. 7, 910-915 [0048]
- SCHUELKE et al. N Engl J Med, 2004, vol. 350, 2682-8 [0048]
- GONZALEZ-CADAVIL et al. PNAS, 1998, vol. 95, 14938-43 [0048]
- MIYAZONO et al. J. Biol. Chem., 1988, vol. 263, 9407-9415 [0048]
- WAKEFIELD et al. J. Biol. Chem., 1988, vol. 263, 7646-7654 [0048]
- BROWN et al. Growth Factors, 1990, vol. 3, 35-43 [0048]
- GAMER et al. Dev Biol., 1999, vol. 208, 222-232 [0048]
- MCPHERRON et al. Nat. Genet., 1999, vol. 22, 280-284 [0049]

15

- NAKASHIMA et al. *Mech Dev.*, 1999, vol. 85, 185-192 [0049]
- GAMER et al. *Dev Biol.*, 1999, vol. 208, 222-22 [0049]
- GAMER et al. *Dev Biol.*, 2001, vol. 229, 407-22 [0049]
- WU et al. *Neuron*, 2003, vol. 37, 187-207 [0049]
- MACIAS-SILVA et al. *J Biol Chem.*, 1996, vol. 271, 25828-36 [0050]
- ESCHBACH et al. *N Engl J Med.*, 1987, vol. 316, 73 [0053]
- D'ANDREA et al. *Cell*, 1999, vol. 57, 277 [0054]
- JONES et al. *Blood*, 1993, vol. 78, 31 [0054]
- WINKELMAN et al. *Blood*, 1992, vol. 78, 24 [0054]
- LIBOI et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, vol. 90, 11351-11355 [0055]
- NOGUCHI et al. *Mol Cell Biol*, 1996, vol. 9, 2804 [0055]
- PATEL et al. *J Biol Chem.*, 1992, vol. 267, 21300 [0055]
- CHIBA et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 646 [0055]
- CHIBA et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, vol. 90, 11583 [0055]
- PHARR et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, vol. 90, 939 [0055]
- STEAD et al. *Blood*, 2008, vol. 108, 1839-1834 [0056]
- MACDOUGALL et al. *N Engl J Med.*, 2009, vol. 361, 1843-1855 [0056]
- QURESHI et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, vol. 96, 12155-12161 [0056]
- NAKANO et al. *Blood*, 2004, vol. 104, 4360-4367 [0057]
- KLINGMULLER et al. *Cell*, vol. 60, 729-738 [0057]
- HILDEN et al. *Blood*, 15 April 1994, vol. 83 (8), 2163-70 [0077]
- ATTISANO et al. *Cell*, 10 January 1992, vol. 68 (1), 97-105 [0078]
- APLIN ; WRISTON. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0092]
- HAKIMUDDIN et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, vol. 269, 52 [0092]
- EDGE et al. *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0092]
- THOTAKURA et al. *Meth. Enzymol.*, 1997, vol. 288, 350 [0092]
- BODANSKY, M. *Principles of Peptide Synthesis*. Springer Verlag, 1993 [0104]
- Synthetic Peptides: A User's Guide. W. H. Freeman and Company, 1982 [0104]
- GOEDDEL. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*. Academic Press, 1990 [0111]
- SAMBROOK ; FRITSCH ; MANIATIS. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0113]
- HOCHULI et al. *J. Chromatography*, 1987, vol. 411, 177 [0117]
- JANKNECHT et al. *PNAS USA*, vol. 88, 8872 [0117]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1992 [0118]
- ZERVOS et al. *Cell*, 1993, vol. 72, 223-232 [0127]
- MADURA et al. *J Biol Chem.*, 1999, vol. 274, 12848-12854 [0127]
- BARTEL et al. *BioTechniques*, 1993, vol. 14, 920-924 [0127]
- IWABUCHI et al. *Oncogene*, 1993, vol. 8, 1893-1898 [0127]
- VIDAL ; LEGRAIN. *Nucleic Acids Res.*, 1999, vol. 27, 818-829 [0127]
- VIDAL ; LEGRAIN. *Trends Biotechnol.*, 1999, vol. 17, 374-371 [0127]
- JAKOBY WB et al. *Methods in Enzymology*, 1974, vol. 48, 1 [0128]
- RICKETTS et al. *Clin Nuc Med*, 1978, vol. 3, 159-164 [0129]
- TANHO et al. *Adv Hematol*, 2010, vol. 2010, 356263 [0129] [0255]
- AIZAWA et al. *Am J Hematol*, 2003, vol. 74, 68-72 [0129]
- DI MATTEO et al. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2008, vol. 22, 211-216 [0129]
- PIPPARD et al. *Lancet*, 1979, vol. 2, 819-821 [0129]
- MUSALLAM et al. *Cold Spring Harb Perspe*, 2012, vol. 2, e013482 [0129] [0261]
- HAIDAR et al. *Bone*, 2011, vol. 48, 425-432 [0261]
- MUSALLAM et al. *Blood Rev*, 2013, vol. 28 (1), 510-519 [0129] [0261]
- GALANELLO et al. *Orphanet J Rare Dis*, 2010, vol. 5, 11 [0129] [0261]
- LEKAWANVIJIT et al. *Can J Cardiol*, 2009, vol. 25, 213-219 [0129] [0257] [0261]
- SCHRIER. *Curr Opin Hematol*, 2002, vol. 9, 123-128 [0130]
- VICHINSKY. *Ann NY Acad Sci*, 2005, vol. 1054, 18-24 [0130]
- RUND et al. *N Engl J Med*, 2005, vol. 353, 1135-1146 [0130] [0260]
- ADAMSON. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw Hill, 2008, 628-634 [0137] [0139] [0141]
- BROWN et al. *Semin Oncol*, 2001, vol. 28 (5), 1-8 [0137]
- GANZ. *J Am Soc Nephrol*, 2007, vol. 18, 394-400 [0137]
- LEVIN et al. *Am J Kidney Dis*, 1998, vol. 27, 347-354 [0138]
- NISSESON. *Am J Kidney Dis*, 1992, vol. 20 (1), 21-24 [0138]
- REVCKI et al. *Am J Kidney Dis*, 1996, vol. 27, 548-554 [0138]
- GAFTER et al. *Kidney Int*, 1994, vol. 45, 234-239 [0138]
- GROOPMAN et al. *J Natl Cancer Inst*, 1999, vol. 91, 1616-1634 [0142]

- HERSHKO. Haematologica, 2006, vol. 91, 1307-1312 [0144]
- CAO et al. Pediatr Rep, 2011, vol. 3 (2), e17 [0144]
- ESPOSITO et al. Blood, 2003, vol. 102, 2670-2677 [0144]
- KALINOWSKI et al. Pharmacol Rev, 2005, vol. 57, 547-583 [0144]
- GALANELLO et al. Ann NY Acad Sci, 2010, vol. 1202, 79-86 [0144]
- NEMETH. Adv Hematol, 2010, vol. 2010, 750643 [0145]
- GARDENGHI et al. J Clin Invest, 2010, vol. 120, 4468-4477 [0145]
- SINGIBARTE. J. Clin Investig, 1994, vol. 72 (6), 838-843 [0147]
- HORL et al. Nephrol Dial Transplant, 2000, vol. 15 (4), 51-56 [0147]
- DELANTY et al. Neurology, 1997, vol. 48, 828-829 [0147]
- BUNN. N Engl J Med, 2002, vol. 346 (7), 522-523 [0147]
- JACOBS et al. Nephrol Dial Transplant, 2000, vol. 15, 15-19 [0148]
- FRALEY et al. Trends Biochem. Sci, 1981, vol. 6, 77 [0179]
- MANNINO et al. Biotechniques, 1988, vol. 6, 682 [0179]
- DENNLER et al. EMBO, 1988, vol. 7, 3091-3100 [0182]
- LEE. J Nucl Med, 1985, vol. 26, 72-78 [0237]
- SOCOLOVSKY et al. Blood, 2001, vol. 98, 3281-3283 [0247]
- YING et al. Blood, 2008, vol. 108, 123-133 [0247]
- DREYFUS. Blood Rev, 2008, vol. 22 (2), 629-64 [0251]
- JABBOUR et al. Oncologist, 2002, vol. 14, 499-499 [0251]
- LIN et al. Blood, 2006, vol. 108, 287-295 [0252]
- BEACHY et al. Hematol/Oncol Clin North Am, 2010, vol. 24, 361-375 [0252]
- BORGNA-PIGNATTI et al. Ann NY Acad Sci, 2005, vol. 1054, 40-47 [0255] [0257]
- SKOW et al. Cell, 1983, vol. 343, 1043-1052 [0256]
- BORGNA-PIGNATTI et al. Expert Rev Hematol, 2011, vol. 4, 353-368 [0257]
- SURAGANI et al. Blood, 2012, vol. 119, 5278-5284 [0258]
- ORTEN. Ann Clin Lab Sci, 1971, vol. 1, 113-124 [0259]
- GANTZ. Blood, 2011, vol. 117, 4425-4433 [0259]

